

dr hab. Anna Szafranek-Nakonieczna
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Wydział Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu
Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów
ul. Konstantynów 1I, 20-708 Lublin

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Wnuk
pt. „Emisja oraz pochłanianie metanu przez gleby zanieczyszczone
metalami ciężkimi w warunkach zróżnicowanego uwilgotnienia”**

Rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Wnuk wykonana została pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Andrzeja Bieganowskiego oraz promotora pomocniczego dr inż. Anny Walkiewicz w Zakładzie Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. Zasadniczą częścią przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej się trzy publikacje, które ukazały się w latach 2017-2020, w czasopiśmie naukowych (ujętych w wykazie MNiSW): *Environmental Science and Pollution Research* (2017), *Catena* (2020) oraz *International Agrophysics* (2020), o sumarycznym współczynniku oddziaływania wynoszącym, zgodnie z rokiem opublikowania, 7,992 (245 punktów MNiSW).

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Wnuk koncentruje się na ocenie wydajności gleb użytkowanych rolniczo w procesach wytwarzania i utleniania metanu oraz ocenie wpływu zróżnicowanych dawek metali ciężkich na ich wydajność. Biorąc pod uwagę fakt, że metan jest jednym z gazów szklarniowych, metanotrofia i metanogeneza należą do najważniejszych procesów klimatotwórczych. Gleby są ekosystemami, w których zachodzi zarówno biologiczne formatowanie jak i utlenianie metanu. Zanieczyszczenia gleb, w większym stopniu dotyczące gleb uprawianych rolniczo, mogą modyfikować zachodzące w nich procesy biologiczne. Jednym z rodzajów zanieczyszczeń spotykanych w glebach są metale ciężkie, których stężenie wzrasta w związku z zabiegami agrotechnicznymi oraz rosnącym zanieczyszczeniem środowiska w wyniku rozwoju przemysłu. Podjęta w rozprawie doktorskiej tematyka badawcza jest zatem ciekawa i aktualna, wpisuje się w nurt badań w ramach dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Ewy Wnuk została przygotowana w sposób typowy dla rozpraw doktorskich. Zamieszczone w rozprawie kopie

artykułów poprzedza: Streszczenie, w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie do opracowania oraz wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, krótki Wstęp, następnie Cel i hipotezy rozprawy doktorskiej, Metodyka i materiały wykorzystane w cyklu publikacji, Wyniki, Podsumowanie i wnioski. Polskojęzyczną część rozprawy, liczącą 40 stron, kończy Bibliografia, która zawiera 96 pozycji, wśród nich głównie prace eksperymentalne z ostatnich 10 lat. Do rozprawy dołączono również oświadczenia współautorów trzech, opublikowanych w czasopismach naukowych, oryginalnych prac, stanowiących integralną część rozprawy doktorskiej oraz kopie tych prac:

P.1: Wnuk E., Walkiewicz A., Bieganowski A. (2017); Methane oxidation in lead-contaminated mineral soils under different moisture levels. *Environmental Science and Pollution Research* 24(32), 25346–25354, doi: 10.1007/s11356-0170195-8.

P.2: Wnuk Ewa, Walkiewicz Anna, Bieganowski Andrzej (2020); Methanogenesis and aerobic methanotrophy in arable soils contaminated with cadmium. *Catena*, 189 (104480), doi:10.1016/j.catena.2020.10448.

P.3: Wnuk Ewa, Walkiewicz Anna, Bieganowski Andrzej (2020); Effect of lead and chloride ions on methane production in arable soils. *International Agrophysics*, 34, 185-193, doi: 10.31545/intagr/118096.

Przedstawione prace są tematycznie spójne. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami Doktorantki oraz współautorów, indywidualny wkład Doktorantki w powstanie prac obejmował współpracowanie koncepcji badań, współudział w określeniu zakresu planowanych doświadczeń, wykonanie większości analiz (przygotowywanie inkubacji mających na celu określenie wydajności procesu metanotrofii i metanogenezy, wykonywanie pomiarów chromatograficznych w trakcie inkubacji próbek, wykonanie pomiarów pH, Eh), opracowanie wyników, wykonywanie analiz statystycznych, przygotowanie pierwszej wersji tekstu oraz współudział w tworzeniu wersji ostatecznej. Na tej podstawie można ocenić, iż rola Doktorantki w przygotowaniu tych prac była znacząca a włączenie ich do rozprawy doktorskiej jest w pełni uzasadnione. Udokumentowane zaangażowanie Doktorantki potwierdza jej samodzielność, umiejętność planowania i prowadzenia badań naukowych jak również umiejętność interpretacji uzyskanych wyników oraz wnioskowania. Tytuł rozprawy doktorskiej odpowiada jej treści.

Pierwszy rozdział rozprawy doktorskiej stanowi Wstęp, w którym w oparciu o źródła literaturowe Doktorantka dokonała charakterystyki metanu, wskazując na jego istotną rolę w kształtowaniu efektu cieplarnianego, omówiła jego źródła jak również rolę gleby w procesach

produkcji i utleniania metanu. W kolejnym podrozdziale Doktorantka przedstawiła czynniki wpływające na procesy wytwarzania i utleniania metanu w środowisku glebowym, do których zaliczyła temperaturę, zawartość materii organicznej, dostępność tlenu oraz metanu, pH i nawożenie a także wilgotności gleb jako czynnik warunkujący aktywność mikroorganizmów zasiedlających gleby. Szczególną uwagę Doktorantka poświęciła obecność metali ciężkich w glebie ze względu na fakt, iż mogą one powodować niszczenie struktury ścian komórkowych, denaturację białek a w efekcie doprowadzić do zaburzeń we wzroście i funkcjonowaniu mikroorganizmów zasiedlających gleby. Do najczęściej spotykanych w glebie i jednocześnie najbardziej toksycznych metali Doktorantka zaliczyła ołów (Pb) oraz kadm (Cd), które są uważane za czynniki modyfikujące ogólną aktywność mikrobiologiczną gleb. Jak dotąd niezbadany był jednak wpływ tych metali na procesy związane z wytwarzaniem i utlenianiem metanu, a fakt ten stał się przesłanką do wykonania niezbędnych badań wypełniających tę lukę w wiedzy. W związku z tym został jasno sformułowany cel oraz postawione hipotezy rozprawy doktorskiej, wyznaczające wyraźny kierunek badań związanych z określeniem wpływu metali ciężkich (Pb i Cd) na procesy metanogenezy oraz metanotrofii w glebach uprawnych.

W kolejnym rozdziale, Metodyka i materiały wykorzystane w cyklu publikacji, Doktorantka zaprezentowała przegląd metod, które posłużyły jej do realizacji postawionego celu. W rozdziale tym zawarta jest również charakterystyka materiału badawczego jakim były gleby mineralne, reprezentatywne dla obszaru Polski: brunatna (*Eutric Cambisol*), biellicowa (*Haplic Podzol*) oraz czarna ziemia (*Mollic Gleysol*), pobrane z poziomu 0-20 cm. Materiał badawczy został wybrany w sposób przemyślany, bazując na naturalnej zdolności gleb do utleniania metanu oraz ich podobieństwie pod względem rozkładu granulometrycznego, który jest odpowiedzialny za kształtowanie warunków wodno-powietrznych w glebie. Doktorantka kierowała się przesłanką, że w glebach o podobnym rozkładzie granulometrycznym, przy zadanej wilgotności uzyskuje się porównywalne warunki wodno-powietrzne. Jest to ważny czynnik decydujący o aeracji gleb a w konsekwencji o wydajności zasiedlających glebę mikroorganizmów w formowaniu i utlenianiu metanu. Jednocześnie taki wybór gleb pozwala na ocenę wpływu genezy gleb na badane procesy. W badaniach celnie zaplanowano warianty inkubacji, uwzględniające nie tylko zróżnicowane dawki metali, bazujące na stężeniu dopuszczalnym, które może być wprowadzone do gleb uprawnych w ciągu roku, maksymalnym dopuszczalnym stężeniu oraz pięciokrotnych stężeniach wspomnianych dawek ale również wilgotność (odpowiadającą różnym wartościom pF), która w środowisku glebowym ulega dynamicznym zmianom w ciągu roku i jak podkreśliła Doktorantka jest warunkiem koniecznym aktywności mikrobiologicznej. W rozdziale tym Doktorantka

zamieściła zbiorczą tabelę, która stanowi przejrzysty przewodnik po zastosowanych wariantach doświadczeń, z podziałem wyników na poszczególne publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. Kolejną część polskojęzycznej pracy to Wyniki. W pierwszym podrozdziale Doktorantka omówiła wyniki dotyczące zdolności badanych gleb zanieczyszczonych przez Pb oraz Cd do utleniania metanu, które zostały zawarte w publikacjach P.1 i P.2, uzupełnione o dane niepublikowane. Dawki Pb i Cd zostały dobrano na podstawie Dziennika Urzędowego Wspólnot Europejskich, Dyrektywy Rady w sprawie ochrony środowiska, w szczególności gleby, w przypadku wykorzystywania osadów ściekowych w rolnictwie (86/278/EWG). Badania te wskazały, biorąc pod uwagę cały zakres badanych dawek, że bardziej toksycznie na proces metanotrofii w badanych glebach wpływał dodatek Pb. Wzrost stężenia Pb z dopuszczalnych dawek rocznych do maksymalnych powodował całkowite zahamowanie procesu metanotrofii w badanych glebach. W glebach z dodatkiem Cd zaobserwowano istotne spowolnienie procesu metanotrofii w próbach zanieczyszczonych najwyższą dawką kadmu a dalsza analiza danych pozwoliła stwierdzić zróżnicowanie badanych gleb pod kątem optymalnych warunków dla przebiegu procesu utleniania metanu. Dla gleby biellicowej (*Haplic Podzol*) oraz czarnej ziemi (*Mollic Gleysol*) była to wilgotność odpowiadająca pF 2,2 podczas gdy dla gleby brunatnej (*Eutric Cambisol*) pF 0. Wskazuje to na warunki hipoksji jako preferencyjne dla aktywności bakterii metanotroficznych zasiedlających tę glebę (publikacje P.1 i P.2). Reasumując wilgotność gleby była czynnikiem silniej wpływającym na proces metanotrofii niż skażenie metalami ciężkimi.

W kolejnej części zostały omówione wyniki dotyczące aktywności metanogenicznej w badanych glebach. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała brak istotnego wpływu dodatku Cd na proces metanogenezy w glebie brunatnej (*Eutric Cambisol*) podobnie w glebie biellicowej (*Haplic Podzol*) z wyjątkiem wariantu z dodatkiem Cd w dawce pięciokrotnej rocznej, kiedy to zaobserwowano wzrost aktywności metanogenicznej w porównaniu z kontrolą oraz nieistotne statystycznie osłabienie intensywności procesu w czarnej ziemi (*Mollic Gleysol*) (publikacja P.2). Natomiast obecność w glebie Pb, w stężeniu odpowiadającym pięciokrotnej maksymalnej dopuszczalnej dawce, powodowała całkowite zahamowanie procesu metanogenezy (publikacja P.3). Ponadto badania potwierdziły, że obecność jonów chlorkowych może w niewielkim stopniu wpływać negatywnie na proces metanogenezy. Kolejną część pracy stanowi Podsumowanie i wnioski, w której Doktorantka w sposób zwięzły podsumowała uzyskane na poszczególnych etapach badań wyniki. Na podkreślenie zasługuje wytrwałość w pracy laboratoryjnej jako że doświadczenia inkubacyjne, zwłaszcza dotyczące procesu metagenezy są długoterminowe (w recenzowanej pracy 160-180

dni) i wymagają systematycznego wykonywania analiz celem określenia intensywności przemian gazowych zachodzących w układach doświadczalnych.

Wszystkie prace włączone do rozprawy zostały opublikowane w czasopismach naukowych, podlegały zatem recenzji specjalistów i zyskały ich rekomendację. Nie mam zastrzeżeń do ich treści merytorycznych. W części polskojęzycznej występują natomiast pewne nieścisłości a jako że rolą recenzenta jest wskazanie elementów, które mogłyby być poprawione dlatego też pozwolę sobie je wymienić:

- Na str. 10 Doktorantka wskazuje, że ważnym gazem cieplarnianym jest ditlenek węgla, potocznie nazywany „dwutlenkiem węgla” po czym w dalszej części pracy wielokrotnie używa terminu „dwutlenkiem węgla” zamiast „ditlenek węgla”.
- Doktorantka używa w rozprawie określenia „gleba jako utleniacz metanu” (str. 14). Słowo utleniacz jest określeniem powszechnie stosowanym w naukach chemicznych, w kontekście przeprowadzonych badań sugeruję używanie raczej określenia „gleba jako środowisko utleniania metanu”.
- Na stronie 15 Doktorantka podaje, że za proces metanogenezy odpowiedzialne są mikroorganizmy należące do domeny *Archaea*, które „wytwarzają metan z octanów i/lub dwutlenku węgla i wodoru” – należałoby uściślić, ponieważ znanych jest wiele innych substratów, które mogą być wykorzystywane przez metanogeny.
- Również na stronie 15 Doktorantka wskazuje że „substraty wykorzystywane przez metanogenne *Archaea* do produkcji metanu, powstają z rozkładu złożonej materii organicznej”, zachodzącego m.in. w reakcji hydrolizy i kwasogenezy. Nie są to pojedyncze reakcje lecz etapy procesu fermentacji i tak też powinny być określane.
- W Tab. 1. (str. 20) Doktorantka podała V_{\max} – wyjaśniając, że jest to maksymalna szybkość reakcji, nie doprecyzowała jednak jakiej. Domyślam się, że chodzi o reakcje utleniania metanu jednak powinno to być jasno zdefiniowane.

Jeśli chodzi o uwagi edytorskie:

- W opracowaniach, publikacjach polskojęzycznych części dziesiątne oddzielamy przecinkiem a nie kropką.
- W opracowaniu występują dwie tabele o numerze 2, na stronie 21 i 22.

Pozostałe błędy edytorskie i stylistyczne, zaznaczyłam w tekście rozprawy.

Podczas czytania rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne pytania o odpowiedź na które proszę Doktorantkę:

- Doktorantka napisała, że wykonywała pomiary Eh na końcu doświadczeń, nie znalazłam w opracowaniu tych wyników dlatego chciałabym zapytać na jakim poziomie kształtowało się Eh i jak wielkie różnice występowały pomiędzy pomiarem początkowym i końcowym w poszczególnych wariantach doświadczeń?
- Jaki widzi Pani sposób aplikacyjnego wykorzystania uzyskanych wyników i czy uważa Pani, że należałoby przeprowadzone badania poszerzyć o inne elementy?

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne opracowanie uzupełniające dotychczasowy stan wiedzy z zakresu wpływu obecności metali ciężkich na intensywność biologicznych procesów związanych z tworzeniem i utlenianiem metanu. Wskazuje, że wpływ metali ciężkich na intensywność tych procesów jest zależny od zastosowanych dawek oraz typu badanej gleby, a w przypadku procesu metanotrofii również od wilgotności gleby. Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, opracowania i interpretacji otrzymanych wyników. Reasumując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Ewy Wnuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Szafranek-Nakonieczna

dr hab. Anna Szafranek-Nakonieczna