

Lublin, 13 lipca 2023 r.

dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS
Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
tel. (081) 537 50 64
email: mwojcik@umcs.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Pauliny Zieleźnik-Rusinowskiej

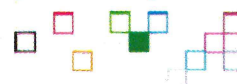
pt. „Wpływ nawożenia i inokulacji mykoryzowej na wybrane parametry fizjologiczne u czterech gatunków roślin spontanicznie zasiedlających zwały skały płonnej”

wykonanej w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
pod kierunkiem dr hab. Eugeniusza Małkowskiego, prof. UŚ

Rejon Górnego Śląska, ze względu na wielowiekowe wydobycie i przetwórstwo surowców mineralnych (głównie węgiel kamienny, rudy metali nieżelaznych i żelaznych), należy do najbardziej uprzemysłowionych, ale jednocześnie najbardziej zanieczyszczonych terenów naszego kraju. Charakterystycznym elementem krajobrazu Górnego Śląska są zwałowiska odpadów poprzemysłowych, a szczególnie odpadów z górnictwa węgla kamiennego, składające się z różnej wielkości uziarnienia karbońskiej skały płonnej. Według raportu NIK z 2019 roku, spośród 153 takich obiektów zidentyfikowanych na terenie Polski, aż 138 zlokalizowanych jest na terenie województwa śląskiego. Zwałowiska pogórnice nie tylko wykluczają ogromne zajmowane powierzchnie z wykorzystania społeczno-gospodarczego, ale stanowią również poważne zagrożenie dla środowiska, w tym zdrowia ludzi, ze względu na rozprzestrzenianie zanieczyszczeń do otaczających je gleb, wód podziemnych i powierzchniowych oraz powietrza. Pokrycie takich składowisk roślinnością w znacznym stopniu może ograniczyć rozprzestrzenianie się zanieczyszczeń. Dlatego poznanie mechanizmów adaptacji roślin, spontanicznie pojawiających się na składowiskach pogórnicej skały płonnej, do zasiedlania takich terenów, a także poszukiwanie sposobów polepszenia wzrostu roślin na tych niezwykle trudnych do funkcjonowania życia biologicznego terenach, jest interesującym i ważnym problemem badawczym. Uważam, że dobór zarówno tematyki badawczej, jak i modeli roślinnych jest jak najbardziej właściwy i uzasadniony, a otrzymane wyniki są oryginalne i wartościowe pod względem poznawczym i aplikacyjnym.

Ocena merytoryczna pracy

Celem pracy było sprawdzenie, jak nawożenie mineralne (NPK z domieszką mikroelementów) oraz inokulacja grzybnią mykoryzową (inokulat komercyjny oraz wyizolowany



z podłoża składowiska, z którego pochodziły badane rośliny) wpływają na wzrost i parametry fizjologiczne czterech gatunków roślin, pojawiających się na zwałowiskach pogórnich w różnych etapach spontanicznej sukcesji. Doświadczenia wazonowe prowadzono w warunkach szklarniowych z wykorzystaniem podłoża i nasion roślin pozyskanych ze zwału węglowego znajdującego się w Gliwicach-Sońnicy. Analizowano dwie dawki nawożenia mineralnego oraz dwa rodzaje inokulum mykoryzowego, stosowane oddzielnie lub w kombinacjach. Po 80 dniach od momentu wysiania nasion analizowano parametry morfometryczne (świeża masa części nadziemnych) oraz fizjologiczne roślin (zawartość chlorofilu, flawonoli i antocyjanów; parametry fluorescencji chlorofilu *a* jako miara sprawności aparatu fotosyntetycznego; poziom peroksydacji lipidów, zawartość H₂O₂ i aktywność katalazy jako wskaźniki stresu oksydacyjnego i jego neutralizacji), a także poziom kolonizacji korzeni grzybnią mykoryzową. Zastosowany układ eksperymentalny jest dobrze zaplanowany i poprawny, wykorzystane metody analityczne są adekwatne do postawionych celów, co pozwoliło na uzyskanie rzetelnych i wartościowych wyników.

Wśród najważniejszych osiągnięć badawczych ocenianej rozprawy należy wymienić:

- wykazanie, że nawożenie mineralne pozytywnie wpływa na wzrost i stan fizjologiczny roślin spontanicznie zasiedlających składowiska skały płonnej. Najlepsze wskaźniki wykazywały rośliny *Calamagrostis epigejos* (trzcinnik piaskowy), który wśród badanych gatunków, nadaje się najlepiej do zasiedlania i stabilizowania zwałów pogórnich.
- wykazanie, że inokulowanie podłoża preparatami mykoryzowymi, zarówno dostępnymi komercyjnie, jak również izolatami autochtonicznych mikroorganizmów ze składowiska, z którego pozyskiwano podłoże i rośliny do badań, nie wpłynęło na częstość wystąpienia mikoryzy, stopień kolonizacji, czy obecność arbuskul. Nie przyniosło również pozytywnych efektów w odniesieniu do wzrostu roślin. Stymulację wzrostu roślin pod wpływem mikoryzy zaobserwowano jedynie w wariantach z równoczesnym zastosowaniem nawożenia mineralnego, co wskazuje, że niedobory makro- i mikroelementów są głównym czynnikiem ograniczającym wzrost roślin, a potencjał grzybów mikoryzowych do mobilizacji tych pierwiastków z podłoża jest widoczny jedynie po ich suplementacji;

Powyższe wyniki mają znaczenie aplikacyjne w planowaniu strategii rekultywacji składowisk odpadów, zwłaszcza z zastosowaniem autochtonicznych gatunków roślin, takich jak *Calamagrostis epigejos*.

Analiza wskaźników fizjologicznych również dostarczyła bardzo interesujących wyników, np.

- stwierdzenie, że poziom stresu oksydacyjnego we wszystkich badanych gatunkach roślin uprawianych na podłożu pozyskanym ze zwałów skały płonnej ulegał obniżeniu po zastosowaniu nawożenia mineralnego i nie był zależny od inokulacji mikroflorą mykoryzową. Wskazuje to, że główną przyczyną wystąpienia wtórnego stresu oksydacyjnego w roślinach jest niedobór substancji mineralnych, co również negatywnie odbija się na wzroście roślin;
- wykazanie, że określona wartościami parametrów fluorescencji chlorofilu *a* wydajność jasnej fazy fotosyntezy była największa przy wyższej dawce nawożenia mineralnego i nie zależała w istotny sposób od aplikacji mikoryzy. Dane te są zbieżne z produkcją



biomasy przez rośliny i wskazują, że pomiar parametrów fluorescencji chlorofilu *a* jest dobrym wskaźnikiem stanu fizjologicznego rośliny i znajduje odzwierciedlenie we wzroście rośliny.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia ogólnie przyjęte wymagania formalne stawiane pracom eksperymentalnym. Treść dysertacji, obejmującej 106 stron maszynopisu, została podzielona na 9 rozdziałów, poprzedzonych wykazem skrótów. Zamieszczone na końcu pracy streszczenia w języku polskim i angielskim wyodrębniono jako oddzielne rozdziały. Dokumentację pracy stanowi w sumie 30 rycin (5 schematów i 25 wykresów) oraz 6 tabel. Wszystkie rozdziały dysertacji zostały przedstawione poprawnie, dostarczając wszelkich niezbędnych informacji, wskazując na orientację Pani mgr Pauliny Zieleźnik-Rusinowskiej w problematyce badawczej oraz umiejętność prowadzenia wywodu naukowego.

Rozdział 1. – „Wstęp” (15 stron maszynopisu) przedstawia syntezę wiadomości, które stanowią doskonałe wprowadzenie do poruszanych w rozprawie zagadnień i wskazują na ich celowość. Doktorantka przedstawiła charakterystykę składowisk odpadów poprzemysłowych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na zwały skał płonnych, warunki stresowe panujące na zwałach oraz etapy naturalnej sukcesji roślinności. Opisała parametry fizjologiczne i biochemiczne wykorzystywane do określenia stanu fizjologicznego rośliny w warunkach stresowych, a także rodzaje mikoryzy i korzyści dla obu partnerów wynikające z tej symbiozy. Na zakończenie przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat badań zwałowisk powęglowych oraz stosowania różnych zabiegów w celu ich rekultywacji.

Rozdział 2. prezentuje „Cel pracy i hipotezy badawcze”. Zostały one sformułowane logicznie i poprawnie, wskazując aspekty poznawcze i praktyczne przeprowadzonych badań.

W kolejnym rozdziale „Materiały i metody”, Autorka przedstawiła charakterystykę gatunków wybranych do badań, warunki uprawy oraz schemat doświadczeń. Opisała również szczegółowo metody badania parametrów fizjologicznych roślin i stosowane analizy statystyczne. Wszystkie procedury i metody badawcze, począwszy od założenia hodowli roślinnych, aż po kolejne przeprowadzane analizy materiału roślinnego zostały opisane precyzyjnie, w sposób pozwalający na ich odtworzenie.

Rozdział IV – „Wyniki” stanowi najobszerniejszą, liczącą 39 stron część maszynopisu. Wyodrębniono w nim trzy główne podrozdziały. Pierwszy opisuje wyniki pomiaru świeżej masy roślin dla czterech gatunków roślin we wszystkich wariantach doświadczalnych, następny kolonizację korzeni przez grzyby mykoryzowe, a ostatni, najobszerniejszy, parametry fizjologiczne. Wyniki są dobrze zilustrowane wykresami i tabelami, jednak zabrakło mi zdjęć przedstawiających wielkość i wygląd roślin w trakcie i na zakończenie eksperymentu.

W rozdziale 5. „Dyskusja”, podzielonym na cztery podrozdziały, Autorka dokonała wielostronnej analizy i interpretacji uzyskanych wyników w odniesieniu do tych opublikowanych w literaturze światowej. Dyskusja została przeprowadzona w sposób bardzo dojrzały, bez zbędnych powtórzeń wyników i w nawiązaniu do stawianych celów i hipotez badawczych.

Podobnie rzeczowy i przedstawiający weryfikację postawionych hipotez badawczych jest kolejny rozdział „Podsumowanie i wnioski”.

Wykaz piśmiennictwa (rozdział 9 – „Literatura”) liczy aż 238 pozycji literatury, w tym tylko 23 pozycje literatury polskojęzycznej. Dobór literatury jest jak najbardziej odpowiedni,



aktualny, bardzo dobrze powiązany z tematyką pracy. Zabrakło jednak w spisie 11 pozycji literatury, do których Autorka odwoływała się w tekście.

Warto wspomnieć, że Autorka swobodnie posługuje się językiem polskim i używa fachowej terminologii, a styl pisania jest gładki i przyjazny dla czytelnika. Mimo, że praca jest napisana bardzo starannie i estetycznie, przy tej objętości tekstu nie udało się uniknąć kilku drobnych pomyłek i nieścisłości, jak również nielicznych błędów natury edytorskiej lub stylistycznej (literówki, przecinki).

Pytania, uwagi, sugestie

Podczas lektury rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań, uwag i sugestii, które jednak nie mają istotnego wpływu na całościową ocenę pracy:

- na str. 13 podano niewłaściwe wzory i nazwy niektórych reaktywnych form tlenu;
- na str. 14 i 17 błędnie wymieniono brom (prawdopodobnie zamiast boru) wśród niezbędnych dla roślin składników mineralnych;
- w jaki sposób oznaczano częstotliwość mikoryzy (F%)? W opisie szacowania poziomu kolonizacji mykoryzowej (str. 27) przedstawiono jedynie skale do oceny stopnia kolonizacji (M%) oraz obfitości arbuskul (A%);
- w opisie pomiarów fluorescencji chlorofilu *a* użyto błędnie nazwę ‘jęczmienia’ zamiast badanych gatunków roślin;
- w podpisach do wykresów należałoby precyzyjnie wskazać znaczenie liter użytych do określenia istotności statystycznej różnic między średnimi wartościami przedstawionymi na słupkach – zamiast „Litery nad kolumnami określają istotne statystycznie różnice” lepiej wyjaśnić np. „Wartości oznaczone takimi samymi literami nie są statystycznie istotnie różne” lub „Różne litery nad kolumnami/słupkami określają istotne statystycznie różnice”;
- przy opisie wyników prezentowanych na wykresach powinno unikać się sformułowań „najwyższą biomasę / najniższą intensywność kolonizacji / najwyższą wartość A%...” itp. w odniesieniu do danych, które nie różnią się statystycznie istotnie od innych danych. Wskazywanie najniższych / najwyższych / rosnących / malejących wartości nie wykazujących różnic istotnych statystycznie w stosunku do innych danych, nawet w kombinacji ze zdaniem w stylu „jednak wyniki nie różniły się statystycznie od pozostałych wariantów” nie ma logicznego uzasadnienia. W tym kontekście należałoby przeredagować opisy wyników, zwłaszcza dotyczących świeżej masy części nadziemnych i poziomu kolonizacji, przy przygotowywaniu manuskryptu do druku;
- czy próbowano wykonać dwuczynnikową analizę wariancji? W odniesieniu do badanego układu eksperymentalnego, gdzie występowały dwa czynniki (nawożenie mineralne i mykoryza – na różnych poziomach) dobrze byłoby wykonać dwuczynnikową analizę ANOVA, żeby sprawdzić istnienie interakcji między tymi czynnikami;
- przy przygotowywaniu wyników do druku sugeruję również wykonać analizy wielowymiarowe, np. PCA (analiza składowych głównych), które pozwoliłyby na odkrycie ewentualnych prawidłowości między badanymi cechami, wskazanie czynników (lub grup czynników), warunkujących największy przyrost biomasy czy skorelowanych z parametrami fizjologicznymi roślin;



- w podpisie do Ryc. 20 (na str. 53) pojawił się błąd, również w spisie literatury pojawiły się pewne nieścisłości w stosunku do literatury cytowanej w tekście, np. pozycja Błońska i in. 2019 występuje dwa razy w spisie literatury w odniesieniu do dwóch różnych artykułów, dlatego te pozycje powinny być rozróżnione w tekście (np. ... 2019a i 2019b), podobnie Sharma i in. 2019; pozycja Diagne i in. – w tekście (str. 19, 21) opatrzona rokiem 2017, a w spisie literatury 2018; podobnie Olszewski 2003 w tekście, a Olszewski 2009 w spisie literatury.

Chciałabym również poznać opinię Doktorantki na temat efektywności stosowania mikoryzy przy uprawie roślin na glebach zasobnych i ubogich w substancje mineralne.

Ciekawi mnie także, jakie dalsze kierunki/perspektywy badań mogą wyłonić się z przeprowadzonych badań i na podstawie uzyskanych wyników.

Podsumowanie i uwagi końcowe

Wobec szerokiego zakresu prezentowanych badań, wartościowych wyników uzyskanych w pracy oraz rzetelnej dokumentacji, dyskusji i interpretacji uzyskanych wyników, przedstawione powyżej uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Zieleźnik-Rusinowskiej.

Podsumowując opinię stwierdzam, że Doktorantka bardzo dobrze wywiązała się ze wszystkich zadań, jakie zostały postawione w celu pracy. Uzyskane wyniki mają szeroki zakres, są wartościowe, nowatorskie i mają aspekt aplikacyjny. Wnoszą istotny wkład w poszukiwanie najskuteczniejszych zabiegów przyczyniających się do jak najlepszego pokrycia składowiskach odpadów pogórnicych roślinnością poprzez poznanie mechanizmów fizjologicznych warunkujących wzrost roślin w takich stresowych warunkach. Doktorantka wykazała się szerokim warsztatem badawczym oraz umiejętnością starannej dokumentacji oraz poprawnej interpretacji uzyskanych wyników.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia warunki 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. z 2017 r. poz. 1789) w nawiązaniu do art. 179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Pauliny Zieleźnik-Rusinowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

