

Dr hab. Małgorzata Pawłowska, prof. PL
Wydział Inżynierii Środowiska
Politechnika Lubelska
Ul. Nadbystrzycka 40B
20-618 Lublin

Lublin, dnia 24.05.2016r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Walkiewicz
pt.: „Wpływ jonów amonowych i azotanowych na aktywność
metanotroficzną gleb w zróżnicowanych warunkach natlenienia”

1. Podstawy formalne sporządzenia recenzji

Oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Walkiewicz dokonano na zlecenie Dyrektora Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, Pana prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego (pismo z dn. 26 kwietnia 2016), na podstawie przedłożonego maszynopisu pracy. Główne kryterium dokonanej oceny stanowiły wymogi stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U. 2014 poz. 1852) oraz Rozporządzeniu MNiSW z dnia 30 października 2015 w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2015, poz. 1842)

2. Trafność wyboru tematyki pracy

Tematyka badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej dotyczy zmian aktywności mikroorganizmów utleniających metan, tzw. metanotrofów, zasiedlających gleby mineralne, pod wpływem stosowania nawozów azotowych. Utlenianie metanu atmosferycznego oraz zapobieganie emisji tego związku z beztlenowych warstw organicznych przez bakterie glebowe, mające zdolność asymilacji węgla lub pozyskiwania energii w procesie utleniania metanu, ma istotne znaczenie w ograniczaniu efektu cieplarnianego. Proces utleniania metanu w glebie jest limitowany przez wiele czynników środowiskowych, które w sposób bezpośredni lub pośredni wpływają na zróżnicowanie taksonomiczne, wzrost i aktywność metanotrofów. Bardzo ważną rolę w tym zakresie odgrywają właściwości fizyczne i chemiczne gleby, które mogą być modyfikowane przez zabiegi agrotechniczne, przede wszystkim zaś przez nawożenie azotowe.

Wpływ nawożenia azotowego na aktywność metanotrofów w glebach uprawnych był przedmiotem wielu badań, jednak ich wyniki nie przyniosły do tej pory jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o jego mechanizm. Co więcej, wpływ ten objawiał się w bardzo różny sposób, począwszy od całkowitej inhibicji, aż do wyraźnego stymulowania procesu. Rozbieżność uzyskiwanych wyników nie została w pełni wyjaśniona. W tym kontekście podjęte przez mgr inż. Annę Walkiewicz badania, uwzględniające powiązanie nawożenia azotem w postaci różnych związków chemicznych ze stanem natlenienia gleby stanowią nowatorski, cenny pod względem naukowym wkład do wiedzy na temat czynników limitujących działanie gleby jako „filtra” oczyszczającego atmosferę z metanu, gazu biorącego udział w tworzeniu efektu cieplarnianego. Objęcie badaniami różnych pod względem genezy oraz właściwości gleb, takich jak: gleba brunatna, bielicowa i czarna ziemia daje możliwość porównania wpływu dawki azotu i formy chemicznej, w jakiej on występuje, na szybkość utleniania metanu.

Oprócz walorów poznawczych podjęte przez Doktorantkę badania mają również znaczenie aplikacyjne, szczególnie w kontekście prognozowanego na najbliższe lata wzrostu zużycia nawozów mineralnych w skali świata. Bardzo ważne jest określenie roli tlenu w procesie usuwania metanu w glebach o różnym stężeniu jonów amonowych i/lub azotanowych. Warunki natleniania gleb uprawnych mogą znacznie się różnić, zarówno w ujęciu przestrzennym, jak i czasowym. Zmiany te mogą być powodowane przez zabiegi agrotechniczne, rodzaj i ilość opadów, sztuczne nawadnianie, czy poziom aktywności oddechowej mikroorganizmów glebowych lub roślin. Ponadto ważne z praktycznego punktu widzenia jest uwzględnienie w badaniach trzech typów gleb, istotnie różniących się właściwościami, pozwalające na ocenę poziomu uniwersalności uzyskanych wyników.

3. Ocena struktury pracy

Recenzowana praca liczy 152 strony (łącznie z Dodatkiem). Jej układ jest zgodny z przyjętym powszechnie schematem rozprawy doktorskiej opracowanej na podstawie wyników badań eksperymentalnych, w którym po zaprezentowaniu celu i zakresu pracy oraz przeglądzie literatury zostaje przedstawiony opis przeprowadzonych badań, omówienie i dyskusja ich wyników oraz wnioski.

Przed spisem treści umieszczono streszczenia w języku polskim oraz angielskim oraz słowa kluczowe. Dalsza część pracy podzielona jest na 9 rozdziałów. Rozdział 1, zatytułowany **Wstęp, cel i zakres** stanowi trzystronicowe wprowadzenie do problematyki badawczej, połączone z omówieniem celu i zakresu badań.

Przegląd literatury przedstawiony w rozdziale 2, zawiera się na 21 stronach (co stanowi ok. 16% objętości pracy, z pominięciem spisu literatury, tabel i rysunków oraz aneksu). Przedstawiono w nim charakterystykę metanu, źródła i sposób jego powstawania, procesy usuwania metanu z atmosfery, ze szczególnym uwzględnieniem

procesów o charakterze biologicznym, czyli utleniania mikrobiologicznego w glebie i czynników wpływających na ten proces.

W rozdziale 3 **Materiały i metody** omówiono wykorzystane w pracy gleby, przedstawiono metody badawcze i obliczeniowe.

Najobszerniejszą część pracy stanowi rozdział 4, w którym zaprezentowano **wyniki badań**. Jest on podzielony na 5 podrozdziałów, w którym przedstawiono kolejno wyniki badań kinetyki procesu, wyniki uzyskane podczas badań prowadzonych na glebie brunatnej, bielkowej, czarnej ziemi, zaś ostatni podrozdział dotyczy porównania wyników uzyskanych we wszystkich glebach w różnych warunkach natlenienia, przy zróżnicowanym nawożeniu.

Kolejny rozdział to **Dyskusja**. Jest on podzielony na 7 podrozdziałów, w których dokonano analizy wpływu badanych czynników na szybkość usuwania metanu, na wielkość ubytku tlenu i przyrostu ditlenku węgla podczas eksperymentów oraz długość fazy opóźnienia procesu utleniania metanu.

Wnioski z badań przedstawione zostały w rozdziale 6, który liczy 2 strony.

Spis literatury liczący 142 pozycje ułożone w kolejności alfabetycznej został przedstawiony w rozdziale 7.

Rozdział 8 to spis tabel i rysunków, które zawarto w pracy, zaś w Rozdziale 9 przedstawiono zestawienie tabelaryczne i graficzne danych źródłowych, na których oparto obliczenia oraz zestawienia porównawcze wyników uzyskanych dla poszczególnych gleb.

4. Ocena merytoryczna

Przeгляд literatury stanowi logiczne wprowadzenie do zagadnień, będących przedmiotem pracy, zwracając uwagę na luki badawcze istniejące w omawianej problematyce. Jednak w mojej opinii zbyt mało miejsca poświęcono na omówienie potencjalnych mechanizmów wpływu azotu na proces utleniania metanu. Przedstawienie schematu powiązań pomiędzy przemianami azotu i metanu w środowisku (rys. 2.8) bez żadnego komentarza jest zbyt prostym, uproszczeniem. W tej części pracy pojawia się szereg nieścisłości i niejasnych pojęć, np. „efekt soli” (Tabela 2.5) i jej powiązanie z „niespecyficzną toksycznością jonów”, czy „wegetacja C3 i C4” (tab. 2.2).

Uwagi szczegółowe odnoszące się do tej części pracy są następujące:

- Z opisu procesu utleniania beztlenowego metanu (str. 19) można wywnioskować, że proces ten został potwierdzony tylko w osadach morskich, ale doniesienia naukowe dotyczą także innych środowisk, np. pól ryżowych.
- Przy opisie wpływu wilgotności (str. 23) warto byłoby nawiązać do zróżnicowanego uziarnienia, bo prawdopodobnie ono, obok zawartości materii organicznej było przyczyną tak dużych różnic przytaczanych wartości optymalnych.

- Tłumaczenie wpływu CO₂ na aktywność metanotroficzną przez wpływ na aktywność populacji metanotrofów jest tautologią. Natomiast tłumaczenie wpływu CO₂ przez współzawodnictwo o tlen wymaga wyjaśnienia (str. 24).
- Przy omawianiu wpływu metali ciężkich brak jest danych na temat stężeń metali, jakie przyjęto w cytowanych badaniach (str. 25).
- Stosowanie pojęcia „wysypisko” zamiennie ze „składowisko” jest nieprawidłowe. Zgodnie z przyjętą terminologią „wysypisko” odnosi się tylko do niezorganizowanych, „dzikich” miejsc, w których gromadzone są odpady, natomiast zorganizowane obiekty przeznaczone do unieszkodliwiania odpadów poprzez ich składowanie to „składowiska”.
- Czy w tabeli 2.4. chodzi o pochłanianie metanu atmosferycznego, czy uwzględnione są też ilości metanu, który nie został wyemitowany do atmosfery na skutek działania metanotrofów. Pojęcie „pochłanianie” było wcześniej używane w kontekście „wychwytywania” metanu z atmosfery.

Jeśli chodzi o ocenę pracy pod kątem metodycznym to na uwagę zasługuje logiczny wybór czynników limitujących proces oraz bardzo staranna obróbka statystyczna wyników, która znacząco podnosi walory naukowe pracy. Nie mam większych zastrzeżeń do metodyki badań wpływu poszczególnych form azotu na szybkość procesu usuwania metanu w glebach o różnym stanie natleniania. Badania prowadzono w układzie stacjonarnym, w testach porcjowych, w trzech powtórzeniach równoległych, co można uznać za liczbę wystarczającą do przeprowadzenia wiarygodnej analizy wyników badań. Układ badawczy stanowił zestaw naczyń szklanych, do których wprowadzano próbki powietrznie suchych gleb, które doprowadzono do założonej wilgotności, a następnie po zamknięciu naczyń zmieniano skład powietrza nad próbą nastrzykując odpowiednie ilości azotu i metanu. W celu oceny procesu utleniania metanu analizowano, za pomocą chromatografii gazowej, skład gazu w przestrzeni nad próbą, a szybkość ubytku stężenia metanu w czasie była podstawą do obliczenia aktywności metanotroficzej. W obliczeniach przyjęto maksymalny czas inkubacji wynoszący 21 dni. W przypadku, gdy metan został w całości usunięty wcześniej, do obliczeń przyjmowano czas, w którym nie stwierdzono obecności metanu w przestrzeni nad próbą. W przypadku eksperymentów, w których obserwowano bardzo długi czas opóźnienia wskazane byłoby wydłużenie czasu trwania badań, gdyż rozpoczęcie procesu utleniania metanu obserwowano dopiero pod koniec eksperymentu.

Pewną wątpliwość budzi natomiast opis badań kinetycznych, z którego nie wynika jasno, czy badania prowadzono na glebach powietrznie suchych czy doprowadzanych do wilgotności 25%, tak jak pozostałe testy, przy którym ewidentnie wskazano, w jaki sposób i kiedy doprowadzono wodę do próby powietrznie suchej. Ponadto, nie wyjaśniono dlaczego inkubacje do wyznaczenia kinetyki prowadzono we fiolkach o innej objętości oraz na próbach o innej masie niż użyte we właściwych eksperymentach. Nie opisano także na czym polegała preinkubacja przy badaniach kinetyki.

Generalnie, opis wyników przedstawiony jest w sposób poprawny, a dyskusja jest logiczna i poparta argumentami bazującymi na wynikach przytaczanych w literaturze naukowej. Jednak w tej części pracy również pojawiły się pewne kwestie, które wymagają komentarza. Oto one:

- Brak nawiązania do stechiometrii procesu utleniania metanu przy analizie ilościowej ubytku metanu i tlenu oraz przyrostu CO_2 nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących przyczyn obserwowanych zjawisk. Przy pełnym utlenieniu 1 mola metanu, przy którym zużywane jest 2 mole O_2 powstaje 1 mol CO_2 , tak więc na pewno utlenieniu 1,11 mmol CH_4 nie może towarzyszyć wydzielenie 10,5 mmola O_2 oraz wydzielenie 18,64 mmola CO_2 . A takie sformułowanie znajduje się w pracy.
- Czym można wyjaśnić większe zużycie tlenu i produkcję CO_2 po dodaniu N-NO_3^- niż po dodaniu N-NH_4^+ do gleby brunatnej (które to zjawisko obserwowano we wszystkich warunkach oprócz sytuacji hipoksji)?
- Bardzo przydatna byłaby analiza zróżnicowania ilościowego i jakościowego mikroorganizmów, choćby ograniczona do rozróżnienia typu I i II. Pozwoliłaby na wskazanie przyczyn zróżnicowania aktywności metanotroficznej badanych gleb. Wysoka aktywność czarnej ziemi w porównaniu do dwóch pozostałych gleb może mieć związek z gatunkami bakterii ją zasiedlających. Geneza czarnej ziemi związana jest z procesami przekształcania materii organicznej w warunkach anaerobiozy, co może wiązać się z produkcją metanu, a więc długoterminowym wystawieniem gleby na wyższe, niż atmosferyczne, stężenia metanu.
- Gleby wzięte do badań, w stanie naturalnym, znacznie różniły się pod względem zawartości biogenów, dlatego przy analizie stężeń różnych związków azotu na końcu eksperymentu wskazane byłoby uwzględnienie różnic w początkowym stężeniu poszczególnych form azotu, bo na przykład niższa zawartość jonów NO_3^- w glebie brunatnej badanej po zakończeniu eksperymentu, w porównaniu do wartości zmierzonych w innych glebach mogła wynikać z wielokrotnie niższej zawartości początkowej tych jonów we wspomnianej glebie, a niekoniecznie była efektem wolniejszej nitryfikacji.

6. Uwagi redakcyjne

Wydaje się, że przygotowaniu pracy towarzyszył pośpiech, co można wnioskować na podstawie jej oceny pod względem językowym i edycyjnym. Autorka nie ustrzegła się błędów interpunkcyjnych, typograficznych, gramatycznych oraz skrótów myślowych. Przykładowe skróty myślowe „powinowactwo gleby do substratu”, „udział gleb wydaje się być nieduży”, „czarna ziemia utleniała metan” „istotnie różne wobec 20% O_2 było 5% O_2 ”, „pobór jonów soli oraz toksycznego jonu NO_3^- (jednego?) przez rośliny”. Część z niedociągnięć formalnych wynika też ze zbyt wiernego tłumaczenia tekstów z języka angielskiego.

Sugeruję unikać pojęć „poniższy”, „powyższy”, w odniesieniu do obiektów przedstawianych w pracy, szczególnie jeśli zajmują one kilka stron (tabele 2.6 - 2.11). Ponadto używanie tego tych określeń jest niepraktyczne, gdyż wraz ze zmianą formatu pracy obiekty ulegają przesunięciu, co sprawia że pojęcia te nie wskazują właściwego położenia tabeli czy rysunku. Wystarczy powołanie się na numer obiektu.

Jakość niektórych rysunków w części literaturowej pracy jest niska: nieczytelny opis ze względu na zbyt małą czcionkę legendy (Rys. 2.6, 2.8), nieprzetłumaczony tekst na język polski (rys. 2.7). W przypadku przedstawienia zależności pomiędzy ilością usuniętego metanu a zawartością poszczególnych form azotu w glebie lepsze byłyby wykresy punktowe oraz wyznaczenie linii trendu.

Reasumując, pomimo przedstawionych uwag do pracy uważam, że stanowi ona wartościowe opracowanie naukowe, a wyniki zaprezentowanych w niej badań wnoszą nowe elementy poznawcze do całokształtu wiedzy na temat czynników decydujących o roli gleb, pozostających pod wpływem antropopresji, w procesach usuwania metanu z atmosfery. Poruszony w pracy problem jest ciekawy od strony poznawczej oraz ważny ze względów praktycznych, bowiem powszechne w praktyce rolniczej stosowanie mineralnych nawozów azotowych nie pozostaje obojętne dla aktywności mikroorganizmów metanotroficznych, mających zdolność utleniania metanu obecnego w środowisku. Autorka wykazała, że spośród badanych czynników, takich jak dodatek azotu, typ gleby, stan natlenienia najbardziej istotny wpływ na zdolność utleniania metanu mikroorganizmów glebowych wywierał właśnie dodatek azotu, choć charakter zmian zależał od typu gleby i stężenia tlenu w powietrzu.

5. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że mgr inż. Anna Walkiewicz spełnia kryteria określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U. 2014 poz. 1852) dla kandydatów ubiegających się o nadanie stopnia naukowego doktora. Doktorantka przedstawiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazała się ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie związanym z problematyką pracy. ***Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie mgr inż. Anny Walkiewicz do dalszych etapów postępowania kwalifikacyjnego o nadanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie agronomia.***

Małgorzata Pińowska