



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, 07.11.2021

Prof. dr hab. Hanna Dahm

Katedra Mikrobiologii

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Uniwersytet M. Kopernika

w Toruniu

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Marty Walentynowicz pt. „ Reakcja olszy szarej (*Alnus incana* (L.) Moench) i olszy czarnej (*Alnus glutinosa* Gaertn.) na zanieczyszczenia pierwiastkami śladowymi Cu, Zn, Cd, i Pb”.

Pracę doktorską wykonano pod kierunkiem Prof. dr hab. Gabrieli Lorenc-Plucińskiej w Instytucie Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku.

Układ pracy

Praca zawarta jest na 145 stronach i jest zredagowana według ogólnie przyjętego schematu: Spis treści, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów, Wstęp (25 stron), Cel pracy, Materiały i metody (12 stron), Wyniki (41 stron), Dyskusja (21 stron), Bibliografia (340 pozycji).

Wybór tematu badań

Naturalny obieg pierwiastków śladowych w przyrodzie charakteryzuje się na ogół zrównoważonym bilansem między ilością uwalnianych pierwiastków w wyniku procesów hipergenicznych a ich wiązaniem w utworach geologicznych. Natomiast wszystkie pierwiastki chemiczne, uruchamiane na skutek różnorodnej działalności człowieka, podlegają tylko w pewnym zakresie różnym formom migracji i częściowemu włączeniu w obieg przyrodniczy.

Zatem rozwój przemysłu, rolnictwa, urbanizacji, transportu i górnictwa oddziałują na zmiany chemiczne produktów spożywczych, powietrza, wody, decydujących o zdrowiu człowieka. Ważnym czynnikiem stanowiącym zagrożenie dla zdrowia i życia organizmów są pierwiastki śladowe.

Wzrost zużycia pierwiastków i związana z tym eksploatacja górnictwa prowadzą do zmian w proporcji między ich uruchamianiem i wprowadzeniem ich do środowiska biologicznego a ponownym odkładaniem w utworach geologicznych.

Pierwiastki, których wydobycie przekracza ich odkładanie w utworach geologicznych stanowią potencjalne zagrożenie dla środowiska. Pierwiastkami o bardzo dużym współczynniku kumulacji są m. in. zbadane w recenzowanej pracy Cu, Cd, Pb i Zn.

Spośród różnych elementów biosfery gleby zajmują szczególną pozycję, ponieważ nie tylko są głównym środowiskiem akumulacji wielu chemicznych substancji zanieczyszczających, ale stanowią także pewnego rodzaju filtr ochronny.

Istnieją ogólne prawidłowości określające zależności stopnia szkodliwości skażeń pierwiastkami śladowymi od właściwości gleb. Gleby zawierające dużo minerałów ilastych oraz gleby o dużej zawartości substancji organicznej mają zdolność silnego wiązania pierwiastków śladowych i zatrzymywania ich w poziomach

powierzchniowych. Pierwiastki związane w formach zabsorbowanych przez mineralne i organiczne kompleksy glebowe ograniczają znacznie biologiczną aktywność gleb.

Wstęp

Treści zawarte we Wstępie podzielone są na trzy główne rozdziały, a te na szereg podrozdziałów. W pierwszym rozdziale charakteryzowane są toksyczne metale występujące w glebie z uwzględnieniem wpływu toksycznych metali śladowych na kondycję roślin oraz reakcje roślin na stężenie pierwiastków śladowych w glebie. W rozdziale tym omawiany jest również problem występowania toksycznych pierwiastków śladowych w badanym Legnicko – Głogowskim Okręgu Miedziowym.

Autorka charakteryzuje badane w pracy metale śladowe, a więc miedź, cynk, ołów i kadm, podkreśla ich toksyczność i informuje, że w Polsce regionem szczególnie narażonym na skażenie gleb tymi pierwiastkami jest właśnie Legnicko – Głogowski Okręg Miedziowy, obszar od dziesięcioleci poddawany antropopresji.

Na terenach sąsiadujących z hutą utworzono strefy ochronne, obszary wydzielone z bezpośredniego korzystania, mające spełniać funkcję izolacyjną w zakresie ochrony środowiska.

Kursem rekultywacji terenów wokół huty stał się kierunek leśny, wykorzystujący w nasadzeniach głównie topole, w mniejszym stopniu robinie akacjową, dąb czerwony czy jesion wyniosły.

Autorka podkreśla, że należy zwrócić uwagę na olsze, które są gatunkami pionierskimi i wykazują naturalną zdolność do kolonizowania różnorodnych środowisk od otwartych krajobrazów, poprzez tereny zalewane po obszary ubogie i zdegradowane. Analizując reakcje roślin na toksyczne stężenia pierwiastków śladowych w glebie, Autorka podkreśla strategię unikania, która polega na zapobieganiu ich wnikania do tkanek roślinnych wskutek unieruchomienia toksycznych jonów metali poprzez asocjację mykoryzową, a także poprzez kompleksowanie metali przy udziale wydzielin korzeniowych oraz przez modyfikację pH ryzosfery i tworzenie bariery redoks.

Inną linią obrony roślin są mechanizmy tolerancji/detoksykacji, polegające na gromadzeniu i unieruchamianiu metali poprzez sekwestrację i kompartmentację w elementach komórkowych rośliny oraz wiązanie ich przez uwalniane kwasy organiczne, polisacharydy, fitochelatyny i metalotioneiny. Ostatnia linia obrony rośliny to uruchamianie mechanizmów chroniących przed stresem oksydacyjnym czyli synteza specyficznych białek, hormonów oraz enzymów.

Gleby ilaste piaszczyste i pylaste, jakie występują na zbadanym terenie, o małej pojemności sorpcyjnej i zwykle o kwaśnym odczynie, słabo sorbują pierwiastki śladowe. W takich glebach pierwiastki są łatwiej przyswajalne i nawet występujące w niskich stężeniach mogą działać toksycznie na rośliny. Na ogół jednak większość pierwiastków śladowych ulega wyługowaniu z tego rodzaju gleb i przedostaje się do wód gruntowych oraz powierzchniowych.

W rozdziale drugim omawiane są olsze jako potencjalne gatunki do nasadzeń na terenach zdegradowanych przez przemysł i podstawowe cechy tych drzew, przemawiające za ich zastosowaniem do upraw w glebach skażonych, między innymi zdolność do symbiozy korzeni olszy z promieniowcem *Frankia* jak również z grzybami mykoryzowymi. Promieniowiec *Frankia* oprócz zdolności do wiązania N_2 uwalnia specyficzne dla danego szczepu ligandy organiczne, zdolne do kompleksowania kationów i oksoanionów metali w celu ich detoksykacji, co może również tłumaczyć zdolność olszy do wzrostu na terenach zanieczyszczonych toksycznymi metalami.

Uważa się, że olsze wywierają korzystny wpływ na różnorodność i aktywność mikroorganizmów w glebie i ryzosferze również ze względu na niską retranslokację N ze starzejących się liści, co powoduje, że ściółka olszy jest bardzo bogata w azot i łatwo ulega mineralizacji. Takie mikroorganizmy również uczestniczą we wspomaganianiu właściwości fitoremediacyjnych olszy.

Trzeci, ostatni rozdział Wstępu omawia powódź jako dodatkowy czynnik stresowy na obszarach zanieczyszczonych przez przemysł. Powodzie występujące na terenach związanych z wydobywaniem metali są szczególnie niebezpieczne, bowiem powodują wzrost stężeń metali śladowych oraz ich dodatkową mobilność z wyrobów górniczych. Niebezpieczeństwo występowania powodzi istnieje także na terenie Legnicko – Głogowskiego Okręgu Miedziowego ze względu na sąsiedztwo rzeki Odry.

We Wstępie umieszczono mapę obszaru strefy ochronnej dla Huty Miedzi Głogów, a także mapę zasięgu występowania Cu i Pb w ilościach przekraczających dopuszczalne stężenia.

Interesujący jest również schemat kluczowych procesów wpływających na rozpuszczalność metali w glebie w wyniku wystąpienia powodzi.

Przedstawiony schemat odpowiedzi komórkowej na stres wywołany jonami toksycznych pierwiastków śladowych jest bardzo przydatny w analizie i zrozumieniu tego zjawiska.

Cel pracy

Celem rozprawy doktorskiej była ocena potencjału olszy szarej (*Alnus incana* (L.) Moench i olszy czarnej (*Alnus glutinosa*) (L.) Gaertn. trzech różnych proveniencji do wzrostu w zanieczyszczonej glebie z obszaru stref ochronnych wokół Huty Miedzi Głogów na potrzeby wykorzystania tych drzew do zalesiania terenów zdegradowanych i czasowo zalewanych.

W tym celu Autorka postanowiła wykonać szeroki zakres badań, obejmujący ocenę pobierania i gromadzenia w tkankach roślin makro- i mikroelementów, w tym toksycznych pierwiastków śladowych; analizę wzrostu i rozwoju obu gatunków olszy uprawianych przez jeden oraz dwa sezony wegetacyjne w zanieczyszczonej glebie; ocenę obecności promieniowca *Frankia* i pomiar aktywności dinitrogenazy; ocenę aktywności mikrobiologicznej gleby w strefie ryzosferowej poprzez zbadanie aktywności enzymów takich jak dehydrogenazy, fosfomonoesterazy, proteazy, ureazy i arylosulfatazy; poprzez analizę ilościową wydzielin korzeniowych, oceniając zawartość w nich rozpuszczalnych związków fenolowych oraz poprzez ocenę objawów stresu oksydacyjnego i zdolność do jego niwelowania (poziom reaktywnych form tlenu RFT, stopień peroksydacji lipidów, aktywność enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów).

Dobór doświadczeń wynikał z postawionych hipotez: (1) olsze są zdolne do wzrostu w podłożu zanieczyszczonym toksycznymi pierwiastkami śladowymi (Cu, Pb, Zn, Cd), (2)

różne gatunki olszy i ich pochodzenie mogą różnić się tolerancją na stres toksycznych pierwiastków śladowych, (3) symbioza z *Frankia* oraz inne drobnoustroje glebowe korzystnie wpływają na wzrost i rozwój olszy w podłożu zanieczyszczonym pierwiastkami toksycznymi, (4) okresowe zalewanie (powodzie) mogą wpływać na wzrost i rozwój olszy i toksyczność pierwiastków śladowych, (5) olsze mogą być wykorzystane w zalesianiu terenów przemysłowych, zanieczyszczonych toksycznymi pierwiastkami śladowymi, narażonych na zalewanie (w pobliżu rzek).

Materiał i metody

Ten rozdział rozprawy również jest opracowany bardzo starannie.

W pierwszej części podano miejsce i czas pobrania prób gleb skażonych do badań z uwzględnieniem terenów zalewanych jednosezonowych i dwusezonowych oraz gleby kontrolnej (referencyjnej). Dokładnie podano również pochodzenie sadzonek obu gatunków olszy do badań.

Na potrzeby doświadczenia uwzględniającego okresowe zalewanie, siewki umieszczano w specjalnie skonstruowanych basenach. Zalanie trwało przez okres odpowiadający okresowi występowania fali kulminacyjnej powodzi w 1997 roku.

Następny cykl badań dotyczył określenia składu i właściwości gleby, oznaczenie zawartości makro- i mikroelementów przed założeniem doświadczenia oraz po jego zakończeniu.

Przeprowadzono również analizy biochemiczne i enzymatyczne ryzosfery, które obejmowały oznaczenie całkowitej zawartości związków fenolowych w glebie, analizę aktywności niespecyficznych dehydrogenaz, fosfomonoesteraz, ureaz, proteaz oraz arylosulfatazy.

Ilościowe analizy mikrobiologiczne obejmowały oznaczenie liczebności promieniowców, bakterii oligotroficznych i kopiotroficznych.

Ostatnim zestawem badan była analiza materiału roślinnego, obejmująca szereg analiz morfo- fizjologicznych roślin: oznaczenie zawartości chlorofilu, morfometryczna analiza liści, badanie składu chemicznego materiału roślinnego.

Analizy biochemiczne roślin obejmowały aktywność enzymów stresu oksydacyjnego (oznaczanie anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru, stopień peroksydacji lipidów). Analizowano także poziom enzymatycznych antyoksydantów, a wśród nich dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy askorbinianowej, peroksydazy gwajakolowej, reduktazy glutationowej.

Oceniano również poziom antyoksydantów nieenzymatycznych. Badana była też aktywność dinitrogenazy, związana ze symbiozą *Frankia*.

Wyniki badań poddano analizom statystycznym, obejmującym analizę wariancji ANOVA/MANOVA (STATISTICA StatSoft Inc.).

Wyniki

Wyniki uzyskane z obszernych badań przedstawiono przejrzysto, wyczerpująco i w sposób różnorodny za pomocą 12 tabel oraz 23 wykresów. Interpretacja wyników jest dokładna, zrozumiała i wskazuje na szeroki zakres wiedzy Autorki, dotyczący zarówno fizjologii roślin jak i biochemii.

Autorka przeprowadziła Dyskusję w sposób sprawny i rozważny, a uzyskane wyniki badań w sposób inteligentny wykorzystała do wyjaśnienia wielu zjawisk na tle wyników uzyskanych przez innych badaczy, opublikowanych w międzynarodowych czasopismach.

Dyskusja obejmuje wszystkie aspekty badań: rodzaj i stopień skażenia gleb, reakcję roślin na skażenie, z uwzględnieniem gatunku, a nawet proveniencji roślin, enzymów obecnych w glebie, ryzosferze, a także enzymów roślinnych odpowiadających za niwelowanie stresu. Wysoki poziom przeprowadzonej dyskusji świadczy o dużej wiedzy Autorki rozprawy.

Bibliografia jest obszerna, zawiera 340 pozycji. Jest tematycznie związana z profilem pracy, aktualna, głównie z ostatnich lat, anglojęzyczna.

Wyniki badań uzyskane przez Autorkę umożliwiły przedstawienie 7 Wniosków, z których wynika, że zarówno olsza czarna jak i szara były zdolne do wzrostu w podłożu

zanieczyszczonym fitotoksycznymi stężeniami pierwiastków śladowych (Cu, Pb, Zn, Cd), ale po dwóch sezonach uprawy następowało istotne zredukowanie biomasy siewek. Nie wykazano peroksydacji lipidów błon komórkowych korzeni drobnych olszy mimo wzrostu RFT i jednoczesnego obniżenia aktywności enzymatycznych antyoksydantów. Prawdopodobną strategią obronną na stres fitotoksycznych metali śladowych były wydzieliny korzeniowe bogate w związki fenolowe oraz redukcja biomasy w wyniku długiej ekspozycji na stres. Zanieczyszczenie środowiska metalami śladowymi, przy jednoczesnym deficycie składników pokarmowych w glebie hamowało rozwój symbiozy z promieniowcem *Frankia* i redukowało aktywność mikroorganizmów w ryzosferze.

Zalewanie zanieczyszczonego pierwiastkami śladowymi podłoża wpływało podobnie na obydwa gatunki olszy (czarnej i szarej): obniżenie biomasy pędu i korzeni, obniżenie zawartości chlorofilu, spadek aktywności mikroorganizmów ryzosferowych, utrzymanie symbiozy z *Frankia*.

Badania wskazują, że wydzieliny korzeniowe bogate w związki fenolowe były czynnikiem obronnym wobec fitotoksycznych metali śladowych także w przypadku okresowego zalewania zanieczyszczonej gleby.

Ostatni wniosek zawiera stwierdzenie, że oba gatunki olszy mogą być wykorzystane do zalesiania terenów ubogich w składniki pokarmowe i zanieczyszczonych przez przemysł wydobywczy, narażonych dodatkowo na występowanie powodzi z sąsiednich rzek.

Ocena ogólna

Rozprawę doktorską mgr Marty Walentynowicz oceniam wysoko.

Jest zaplanowana logicznie, każde zadanie zmierza do określonego celu i eliminuje błędne założenia. Wszystkie zadania badawcze Autorka zrealizowała przy użyciu różnorodnych metod fizjologicznych, biochemicznych, mikrobiologicznych, które pozwoliły osiągnąć założone cele z sukcesem poznawczym.

Wyniki przedstawione są precyzyjnie i omówione bardzo dokładnie. Interesująca jest dyskusja, konfrontująca pozytywnie uzyskane wyniki z obszerną literaturą o zasięgu międzynarodowym.

Z przekonaniem o wysokiej wartości ocenianej rozprawy doktorskiej przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Dendrologii PAN wniosek o dopuszczenie mgr Marty Walentynowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Ze względu na wysoką wartość naukową tej pracy składam do Rady Naukowej wniosek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Hanna Dahm