



RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.

„Biogeochemia azotu wysokogórskich zbiorowisk roślinnych Karkonoszy„

wykonanej przez Pana mgr Adama Rajsza w Katedrze Ekologii Biogeochemii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Bronisława Wojtunia, promotor pomocniczy dr Małgorzata Reda

**1. Uwagi wstępne**

Badania Pana prof. dr hab. Bronisława Wojtunia od wielu lat koncentrują się wokół zagadnień ekologicznych terenów górskich Sudetów i Tatr, gdzie zajmuje się charakterystyką ekologiczną i przekształceniami zbiorowisk roślinnych piętra subalpejskiego i alpejskiego. Rozprawa doktorska dr Rajsza wpisuje się w te zagadnienia i poszerza stan wiedzy dotyczy badania zależności pomiędzy różnymi formami roślinnymi i zbiorowiskami roślin w kontekście wykorzystywania różnych form azotu dostępnych w piętrze alpejskim i subalpejskim Karkonoszy. Badania prowadzono na czterech zbiorowiskach wysokogórskich: wrzosowiskach (AFCF), murawach bliźniaczkowych (CRN), zaroślach kosodrzewiny (PMS) i nitrofilnych ziołoroślach (RA) zróżnicowanych pod względem zaopatrzenia w azot (i jego formy) jak też o różnym tempie i formie wzrostu. Podstawowym celem pracy była analiza sezonowa biogeochemii azotu dla tych zbiorowisk roślinnych z wykorzystaniem aż 10 zmiennych środowiskowych (np. pH gleby azot amonowy, azotanowy, organiczny, całkowity, węgiel całkowity, C/N), i wyjaśnienie, czy istnieje związek pomiędzy strategią pobierania form azotu a aktywnością reduktazy azotanowej (pomiar *in vivo*). Na podstawie uzyskanych wyników podjęto próbę interpretacji: które czynniki środowiskowe mają największe znaczenie w przemianach azotu w zbiorowiskach wysokogórskich. Doktoranta interesowało również czy odpowiedź rośliny jest specyficzna gatunkowo czy też zależy od warunków środowiska. Praca na charakter interdyscyplinarnej.

Azot jest makroelementem niezbędnym do prawidłowego wzrostu i rozwój roślin, jest obecny w największych ilościach w tkankach roślinnych. Głównymi, dostępnymi dla roślin wyższych formami azotu nieorganicznego w roztworze glebowym są azotany ( $\text{NO}_3^-$ ) i jony amonowe ( $\text{NH}_4^+$ ), których zawartość w ekosystemach jest bardzo zróżnicowana. Gatunki roślin różnią się zdolnością do pobierania i metabolizowania azotu. Większość roślin lądowych jako źródło azotu nieorganicznego wykorzystuje zarówno azotany jak i jony amonowe w różnych proporcjach zależnie od specyficznych preferencji gatunku. Asymilacja jonów jest regulowana przez zapotrzebowanie roślin na azot oraz jego dostępność, i jest ściśle powiązana z metabolizmem węgla. Koordynacja obu dróg pojawia się na różnych poziomach organizacji. Pobieranie jonów azotanowych jest stymulowane w obecności azotanów i hamowane przez aminokwasy i jony amonowe. Procesy te są regulowane przez światło i stężenie  $\text{CO}_2$  (poprzez dostępność węglowodanów). Metabolizm azotu jest nie tylko kluczowym procesem w fizjologii roślin, ale również ważną częścią globalnego cyklu jego przemian. Znajomość wykorzystania N przez różne gatunki roślin i o różnej formie wzrostu czy też typie metabolizmu jest ważna w aspekcie składu gatunkowego ekosystemów i ich produktywności.

Poznanie strategii odpowiedzialnych za asymilację różnych form azotu przez rośliny reprezentujące różne zbiorowiska i formy wzrostu roślin piętra alpejskiego i subalpejskiego oraz charakterystyka gleby w aspekcie sezonowych zmian biogeochemii azotu stały się głównym celem pracy Doktoranta. Czynniki środowiskowe mogą obniżać wiązanie węgla i nawet wysoce wydajne rośliny mogą inwestować mniej N na jednostkę powierzchni liścia. W warunkach ograniczonej zawartości N, wzrost jednego parametru wiąże się z obniżeniem innego. Aklimatyzacja roślin np. do natężenia światła, temperatury, zawartości wody i pH gleby ma wpływ na dystrybucję N, w taki sposób, że procesy metaboliczne mogą być w różnym stopniu limitowane czynnikami środowiskowymi.

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest próbą z jednej strony podsumowania tego, co możemy powiedzieć o czynnikach warunkujących pobieranie azotu przez rośliny, natomiast z drugiej przynosi niezwykle ważne i nowe informacje na ten temat roli zbiorowisk roślinnych w biogeochemii azotu.

## **2. Uwagi formalne.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia ogólnie przyjęte wymagania stawiane pracom eksperymentalnym. Obejmuje 155 stron tekstu, w tym piśmiennictwo zawierające 269 pozycji literatury oraz dokumentację wyników, na którą składa się 26 rycin i 14 tabel,

ponadto do pracy dołączono aneks zawierający zdjęcia 4 badanych zbiorowisk oraz 4 tabele do zdjęć fitosocjologicznych zbiorowisk.

Treść pracy podzielona została na 10 rozdziałów. Zamieszczony na 5 stronach „Wstęp„ stanowi bardzo krótkie wprowadzenie do rozprawy. Stosunkowo niewiele miejsca poświęcono na rozważania wpływu czynników środowiskowych na pobieranie różnych form azotu, zwłaszcza natężenia światła (pomiarów wykonywano w różnych porach roku) w kontekście pomiarów aktywności reduktazy azotanowej, jak też na temat relacji asymilacja węgla/azotu, i w tym zakresie czuje się pewien niedosyt.

„Wstęp„ stanowi wprowadzenie dla sformułowania celów pracy przedstawionych jako kolejny, drugi rozdział. W rozdziale tym doktorant krótko określa zagadnienia badawcze będące przedmiotem pracy. Cel metodyczny dotyczący opracowania systemu do terenowych oznaczeń reduktazy azotanowej jest ważnym aspektem prowadzonych badań, ale moim zdaniem powinien być przesunięty z punktu 1 do 3a.

Następnie, Rozdział 3, to przedstawienie hipotez badawczych, kolejno Rozdział 4, to opis terenu badań uwzględniający: rzeźbę terenu, klimat, charakterystykę szaty roślinnej. Do tej części pracy dołączono również 2 ryciny pokazujące mapę terenu gdzie prowadzono badania.

Rozdział 5, „Materiał i Metody„ przedstawiony został na dalszych 9 stronach, zawiera obszerny opis konstrukcji terenowej łaźni wodnej do pomiarów aktywności reduktazy azotanowej w terenie i opis stosowanej metodyki pomiaru aktywności enzymu (szkoda, że ilustracje do opisu znajdują się w rozdziale "Wyniki"); podstawy wyboru gatunków roślin i zbiorowisk roślinnych; charakterystyki ilościowej i jakościowej roślinności wykonanej na podstawie zdjęć fitosocjologicznych (brak w pracy); oznaczanie pH gleby, zawartości azotu amonowego, azotanowego, organicznego i całkowitego, węgla całkowitego; oznaczanie tempa mineralizacji azotu glebowego i inne. Wyniki opracowano statystycznie wykorzystując odpowiednie programy (Statistica, XLStat) i testy. Do badania różnic między zbiorowiskami stosowano test ANOVA, wykorzystano również wielowymiarowe analizy danych w oparciu o macierz: 87 gatunków X 36 stanowisk X 10 zmiennych siedliskowych.

Opis metod pokazuje jak ogromną pracę eksperymentalną wykonał Doktorant.

Doktorant wykazał się obszernym i nowatorskim warształem badawczym, od powszechnie stosowanych metod analitycznych, przez konstrukcję łaźni wodnej (patent) do pomiarów terenowych aktywności reduktazy azotanowej (NR), po skomplikowane i trudne interpretacyjnie techniki statystyczne. Opis metod jest czasem zbyt ogólny, ale pozwala na ocenę sposobu prowadzenia badań i ich jakości.

Rozdział „Wyniki” obejmujący 42 strony, został podzielony na 6 podrozdziałów i dodatkowo na części odpowiadające wykonywanym zadaniom badawczym. Rozdział ten jest dobrą analizą uzyskanych danych w kontekście prac innych badaczy i pokazuje kolejne etapy dochodzenia do wytyczonych celów. Dobra rysunkowa ilustracja wyników, choć nie było potrzeby prezentować tych samych wyników w postaci zarówno rycin jak i tabel. Fragment dotyczący łaźni wodnej (str. 28-31) powinien być umieszczony w rozdziale "Materiał i Metody".

W rozdziale „Dyskusja”, stanowiącym najbardziej obszerną i najlepiej napisaną część pracy (kolejne 46 stron), podzielonym na 5 podrozdziałów i 11 części Doktorant starał się wszechstronnie analizować uzyskane wyniki, w kontekście danych uzyskanych przez innych badaczy i z trafnymi komentarzami. Czasem wyniki omawiane są one zbyt szczegółowo i są powtórzeniem opisu z rozdz. Wyniki. Rozdział dyskusja napisany jest bardzo przejrzysto. Doktorant starał się podkreślić swoje najważniejsze osiągnięcia w odniesieniu do celu badań i na tle badań innych autorów. Należy podkreślić, że dyskusja, w świetle uzyskanych wyników często pośrednich i trudnych interpretacyjnie stanowiła dla doktorantki duże wyzwanie, z którego wywiązała się bardzo dobrze.

Praca zawiera również zwięzłe podsumowanie wyników, wnioski z wypunktowanymi najważniejszymi osiągnięciami oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Cytowane piśmiennictwo jest niezwykle obszerne (269 pozycji), prace cytowane są zarówno z zakresu geochemii azotu jak i żywienia mineralnego, systematyki roślin, metabolizmu, mechanizmów pobierania jonów i inne, co świadczy o tym, że autor doskonale orientuje się w zakresie problematyki badawczej. Prace znakomicie wykorzystane zostały w dyskusji. Brak w pracy spisu stosowanych skrótów.

Pod względem formalnym praca jest skonstruowana poprawnie.

Spośród wielu interesujących i naukowo ważnych wyników uzyskanych przez Pana mgr Rajsza na szczególne podkreślenie zdaniem recenzenta zasługują:

Wykazanie:

1. że w Karkonoszach w piętrze alpejskim i subalpejskim występują niezależnie od typu zbiorowiska roślinnego gleby kwaśne (pH 3.9-5.4); zawierające głównie  $N-NH_4^+$  i dominują tam gatunki wolno rosnące; sezon wegetacyjny praktycznie nie ma wpływu na pH gleby; tempo mineralizacji N w glebie różni się w badanych zbiorowiskach,
2. zależności pomiędzy aktywnością reduktazy azotanowej (NR) a tempem wzrostu roślin; aktywność NR różniła się pomiędzy gatunkami, siedliskami i

formami wzrostu. Największą aktywność odnotowano dla ziół nitrofilnych (RA) a najniższą dla roślin wrzosowatych ((AFCN). Wyniki te korelowały z tempem mineralizacji N w glebie, wskazując na niski metabolizm azotanów

3. Pomiary aktywności NR wykonano po raz pierwszy w terenie (*in vivo*), w Europie Środkowej i dla roślin pasma górskiego
4. Na podstawie aktywności NR, dla wybranych gatunków skorygowano wartości N liczb Ellenberga
5. C/N wykazywał niewielkie zmiany w ciągu cyklu wegetacyjnego

### 3. Uwagi szczegółowe.

Rozprawa przygotowana jest starannie, napisana dość dobrym językiem, jest dobrze zredagowana, kolejność rozdziałów jest zachowana, prawidłowo cytowane prace i spis literatury odpowiedni. Jak na dzieło liczące 155 stron praca zawiera niewiele błędów stylistycznych i literowych, występują czasem błędy natury redakcyjnej i nieprecyzyjne sformułowania. Większość zaznaczono w tekście pracy. Generalnie, Autor zgromadził pełny i atrakcyjny zestaw wyników, które z pewnością nadają się do opracowania publikacji naukowej. W swoim obszernym i kompleksowym opracowaniu Autor nie ustrzegł się jednak pewnych niedociągnięć czy niejasności, z których niektóre wymienię:

1. proszę o komentarz do podsumowania (str. 97) "asymilacja azotu, szczególnie w formie azotanów jest wysoce energochłonna, stąd od wydajności fotosyntezy zależność będą w dużej mierze możliwości energetyczne rośliny", o jakie możliwości energetyczne chodzi? czy nie o czynniki redukcyjne pochodzące z fotosyntetycznego transportu elektronów?
  2. str. 71 "Udowodniono dla wybranych gatunków, że metoda oznaczania NRA *in vivo* lepiej niż *in vitro* odzwierciedla realną asymilację  $\text{NO}_3^-$ , a także tempo asymilacji  $\text{CO}_2$  i stan fizjologiczny komórki" proszę o komentarz
  3. aktywność NR zależy od natężenia światła, w metodyce brak informacji jak rozwiązano tę sprawę pobierając materiał roślinny z różnych części rośliny czy w pomiarach sezonowych. Ponadto str.74 napisano "Warunki pogodowe powyżej górnej granicy lasu w Karkonoszach były wysoce niestabilne" nie wspomniano o nasłonecznieniu. Brak też tego elementu w dyskusji.
  4. Uzasadnić konkluzję str. 82 "aktywność reduktazy azotanowej zależy przede wszystkim od pozycji taksonomicznej gatunku, a w mniejszym stopniu od warunków ekologicznych"
- Drobne uwagi:

- Nie podano np. który liść i jakie fragmenty liścia traw brano do oznaczeń NR, jest to ważne gdyż poszczególne segmenty liścia odzwierciedlają różne stadia rozwojowe komórek, a więc mają wpływ na aktywność enzymu.
- w tekście wielokrotnie aktywność NR podawano wymiennie jako  $\mu\text{M}$ : jonów azotynowych lub dwutlenku azotu, a suchą masę przedstawioną jako D. W. lub s. m.:  $\mu\text{M NO}_2\text{-g}^{-1}\text{ DW h}^{-1}$  (np. str 38),  $\mu\text{M NO}_2\text{ h}^{-1}\text{ g}^{-1}\text{ s.m.}$  (np. str. 39). Dotyczy to również Ryc. 6, 7, 8
- w legendach pod wszystkimi rycin i w tabelach należało podać odpowiednie jednostki
- w tekście jest wiele niezręcznych sformułowań czy skrótów myślowych np:

str. 45 "jest to też najniższy odczyt zawartości tej formy azotu wśród badanych zbiorowisk" raczej najniższa zawartość

str. 65 "Skróty nazw przedstawiono jedynie dla gatunków o największym pokryciu i częstości" lepiej dla gatunków zajmujących największą powierzchnię i występujących najczęściej

str. 73 "uchwycenie stanu fizjologicznego rośliny występującego w niezaburzonych warunkach otoczenia zewnętrznego " zapewne chodzi o warunki normalne

str. 73 co to oznacza "czas trwania reduktazy azotanowej w formie natywnej"

str 105 napisano "ujemny przyrost formy  $\text{N-NH}_4^+$ " chyba lepiej powiedzieć obniżenie zawartości i inne

- w każdym podrozdziale pracy występują drobne błędy literowe
- w legendach rycin zamiast "słupek błędów" lepiej podać odchylenie standardowe
- w bardzo obszernym "Piśmiennictwie" brak ujednolicenia cytowanej literatury (należało użyć obowiązujące skróty nazw czasopism lub ich pełne brzmienie, wielka lub mała litera). Ponadto czasem brak wydawców w cytowanych monografiach, roku wydania, tomu lub stron.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że oceniana praca pod względem poziomu merytorycznego i wartości poznawczej, zasługuje na wysoka ocenę, a wskazane w niniejszej recenzji uwagi nie obniżają jej wartości merytorycznej. Część wyników została już opublikowana i z pewnością będą jeszcze publikacje w czasopismach wysoko-impaktowanych. Dane uzyskane przez doktoranta mogą stanowić (i zapewne będą) punkt wyjścia do badań innych aspektów związanych z geochemią azotu np. relacji C/N. Wszystkie

moje uwagi, mają głównie charakter redakcyjny i dyskusyjny, pozostają bez wpływu na merytoryczne walory pracy, którą oceniam wysoko.

#### 4. Uwagi końcowe

Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Adama Rajsza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką jakość uzyskanych wyników i ich znaczenie poznawcze, a także na profesjonalny sposób ich opisu na tle aktualnego stanu wiedzy stawiam także wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie niniejszej pracy.

Warszawa 28.08.18

prof. dr hab. Elżbieta Romanowska

  
**KIEROWNIK**  
ZAKŁADU MOLEKULARNEJ FIZJOLOGII ROŚLIN  
INSTYTUTU BOTANIKI  
Wydziału Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego  
prof. dr hab. Elżbieta Romanowska

**UNIwersytet Warszawski**  
WYDZIAŁ BIOLOGII  
INSTYTUT BOTANIKI  
ZAKŁAD MOLEKULARNEJ FIZJOLOGII ROŚLIN  
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1  
tel. (+48 22) 55 43 116, 55 (+48 22) 55 43 910

Uniwersytet Wrocławski Wydział Nauk Biologicznych (3)		
Wpłynęło do WNB	03 -09- 2018	Załączniki
Wpi. do jedn. org.	Data	Symbol
Znak sprawy		