

Dr hab. Grzegorz Makulec, prof. UKSW
Instytut Ekologii i Bioetyki WFCh,
Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego
w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Podolak-Machowskiej "Reakcje dżdżownic (Lumbricidae) na stres na poziomie populacyjnym i komórkowym"

Na wstępie chciałbym przedstawić mało znany przykład wykorzystania dżdżownic do celów leczniczych zaczerpnięty z dzieła ks. Krzysztofa Kluka wydanego w 1780 roku: "Zwierząt domowych i dzikich historyi naturalney początku i gospodarstwo. Tom IV o owadzie i robakach". "*Niemasz skuteczniejszego lekarstwa na osłabione nerwy, jak olejek z nich (dżdżownic) dla wielości soli lotney w nich się nayduiącej. Olejek zaś ten czyni się tak. Na funt zebranych Glist i w wodzie opłokanych, nalewa się funt oliwy i szklanka białego wina: gdy tak postoją 24 godzin, przystawia się do wolnego ognia, a kiedy wino wyparnie olejek się precedzi i zachowa do zażycia.*"

Obecnie, po ponad dwóch stuleciach nasza wiedza i możliwości czerpania korzyści z aktywności i biomasy niektórych gatunków dżdżownic znacznie wzrosły. Różnorodne formy wykorzystania *Eisenia fetida* i *E. andrei* przez człowieka pozwalają bez nadmiernej przesady uznać je za kolejne, obok pszczół i jedwabników bezkręgowce zwierzęta udomowione. W dużym zakresie potwierdza to także rozprawa doktorska mgr Agnieszki Podolak-Machowskiej.

Cel badań oraz uzasadnienie wyboru tematyki

Maszynopis pracy obejmuje prawie 150 stron tekstu, w tym spis literatury zawierający 296 pozycji. Do pracy załączony jest blisko 50 stronicowy aneks przedstawiający rezultaty analiz statystycznych. Badania mgr A. Podolak-Machowskiej koncentrują się na trzech powiązanych z sobą obszarach tematycznych. W pierwszym z nich przeprowadzono w cyklu rocznym szczegółowe badania dynamiki liczebności, biomasy i rozrodczości dwóch gatunków kompostowych *Eisenia fetida* i *Dendrobaena veneta* pod kątem wykorzystania ich do transformacji odpadów organicznych (wermikompostowania). Kolejny obszar tematyczny to analiza rozwoju populacji obu wspomnianych gatunków dżdżownic w sytuacji narażenia osobników na powtarzający się stres wywołany działaniem prądu stałego 4,5 V. Interesujące

i innowacyjne badania w trzecim obszarze tematycznym poświęcone są testowaniu wpływu farmakologicznych środków znieczulających na dżdżownice. Doktorantka opracowała "przyżyciowe" stężenia prokainy i lidokainy pozwalające na okresowe unieruchomienie dżdżownic. Otwiera to drogę do wykorzystywania ich na równi z drobnymi kręgowcami do testowania różnorodnych specyfików bez konieczności uzyskiwania opinii komisji etycznych.

Cele pracy zostały krótko zdefiniowane na stronie 8. Uzasadnienie takiego wyboru zadań badawczych obejmuje prawie 30 stron i nie zawsze jest powiązane z głównym tematem np. dotyczy kategoryzacji tzw. usług ekosystemalnych, charakterystyki podsystemu glebowego jako miejsca bytowania edafonu, wermikompostowania i biomonitoringu z wykorzystaniem dżdżownic. Rozbudowa części wstępnej (np. kosztem usług ekosystemalnych) o bardziej szczegółowe przedstawienie gatunków kompostowych (rozdział 3.2.2) znacznie ułatwiłoby późniejszą interpretację wyników. Dostępne literaturowe dane o rozmiarach, tempie wzrostu, płodności, liczbie składanych kokonów wraz z Tab. 1 mogłyby znaleźć się w krótkiej charakterystyce obiektu badań. Poza tym ta część rozprawy doktorskiej nie budzi zastrzeżeń.

Poprawność zastosowanych metod badawczych

Opis metod powinien dawać pełne wyobrażenie o sposobie przeprowadzenia badań, a tym samym również o wiarygodności uzyskanych wyników. Z tego względu nie powinno się pomijać żadnych, nawet wydawałoby się mało ważnych szczegółów mogących jednak mieć znaczenie i wpływ na końcowe rezultaty naszych badań. We wszystkich podłożach hodowlanych, jako pokarm podawano wytloki jabłek, marchwi, buraków, gotowane resztki ziemniaków (obierki?) oraz celulozę w stosunku 4:1 (tekst str. 39, Tab.2, dyskusja str. 116). Ponadto, "objętość pokarmu ...była dostosowana do wymagań rozwijających się populacji, (tzn. przekraczała wymagania)" (str. 39). Nic nie wiadomo w jakiej formie dostarczano celulozę, czy była to sproszkowana celuloza chemicznie czysta, czy celuloza wyrobów przemysłu papierniczego w postaci papieru lub tektury? W jaki sposób przygotowywano celulozę i czym kierowano się aplikując ją w proporcji 4:1? W tym miejscu czytelnik nie ma też pewności czy objętość odpowiednio spreparowanej celulozy obliczano w stosunku do resztek ziemniaczanych czy względem wszystkich aplikowanych odpadków kuchennych (Tab. 2, 3)?

Hodowle i eksperymenty z wykorzystaniem *E. fetida* i *D. veneta* prowadzone były przez okres 52 tygodni w dwóch kombinacjach: jako populacje pełne (A) w których żyły i swobodnie rozwijały się wszystkie stadia rozwojowe dżdżownic, oraz tzw. populacje

niepełne (B), w których utrzymywano wyłącznie 10 osobników dojrzałych płciowo a złożone przez nie kokony liczono i odbierano w comiesięcznych kontrolach. Doktorantka nigdzie nie wyjaśnia w jakim celu stworzono wariant "populacji niepełnych". Czy miały służyć do oceny płodności badanych gatunków (liczba kokonów na osobnika) w warunkach braku przegęszczenia i przy pełnym dostępie pokarmu, czy w innym celu?

Ocena liczby złożonych kokonów w "populacjach pełnych" może także budzić pewne wątpliwości? Wybieranie i liczenie kokonów w odstępach 4-tygodniowych i zwrotne wprowadzanie ich do podłoża może skutkować ponownym policzeniem części kokonów, które nie zdążyły się wykluć w okresie między kontrolami. Co prawda, w dyskusji (str. 113) autorka przytacza dane Domingez'a i Edwards'a (2011) dotyczące czasu inkubacji kokonów dla *E.fetida* jako 18-26 dni, zaś dla *D.veneta* około 42 dni. Jednakże, według innych dostępnych danych z Edwards'a (Agric.Ecos.Envir. 24, 1988) okres inkubacji kokonów wynosi odpowiednio 32-73 dni dla *E.fetida* oraz 40-126 dni dla *D.veneta*. Czy wobec tego można być pewnym, że jakaś partia kokonów w "populacjach pełnych" nie jest liczona dwukrotnie? W hodowlach *D.veneta*, przybliżona, całkowita liczba złożonych kokonów do 44 tygodnia skalkulowana na podstawie Ryc. 23 (z wyłączeniem ostatniej kontroli) wynosi ok. 2 tysięcy i jest prawie dwukrotnie wyższa od końcowej liczby wszystkich osobników w hodowli (Tab. 10). Nie ma podobnej dysproporcji w hodowlach *E.fetida* (Ryc.16, Tab. 10).

Nie znalazłem żadnych informacji o liczbie i sposobie pobierania prób do analiz chemicznych, zarówno z materiału wyjściowego, jak i z wytworzonego wermikompostu. Czy były to pojedyncze próby z każdego z trzech pojemników czy próby mieszane z kilkoma podpróbkami? W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na stosowany głównie w tabelach zagadkowy termin "warstwa stratyfikacyjna". W pojemnikach, z uwagi na działalność dżdżownic i częste kontrole raczej nie było żadnego rozwarstwienia/stratyfikacji. Domyślam się, że wspomniana "warstwa stratyfikacyjna" to po prostu zakupiona kwiatowa ziemia uniwersalna wykorzystywana jako podłoże hodowlane dla dżdżownic? W imię nieco przesadnej troski o poprawność metodyczną badań, należałoby część takiego podłoża przeznaczoną do przyszłych analiz pozostawić przez 52 tygodnie w komorze klimatycznej (nie klimatyzacyjnej) utrzymując podobne warunki, jak w hodowlach dżdżownic?

Użyte do opracowania wyników badań testy i analizy statystyczne, głównie z wykorzystaniem programu STATISTICA v. 10 są dobrane właściwie i wykonane poprawnie. Rezultaty są cytowane w tekście, na wykresach, w tabelach a także są dostępne w aneksie na końcu pracy.

Umiejętność przedstawienia i analizy wyników badań

Prezentacja rezultatów badań obejmuje prawie 60 stron maszynopisu. Wyniki eksperymentów są dobrze opisane i udokumentowane tabelami i wykresami. Nie dostrzega się dublowania danych równocześnie w tabelach i na wykresach. Rysunki przygotowane poprawnie, osie oznakowane i jednoznacznie opisane, legenda zrozumiała a kolorystyka dokumentacji graficznej przyjazna również dla daltonistów i recenzenta. Rozprawa ilustrowana wieloma fotografiami własnymi doktorantki dobrze dokumentującymi procedury i wyniki eksperymentów.

Opis wyników kolejnych doświadczeń jest przedstawiany według podobnego schematu, co ułatwia czytelnikowi porównywanie rezultatów uzyskanych w różnych kombinacjach doświadczalnych. Tekst tego rozdziału został podzielony na trzy części odpowiednio do celów sygnalizowanych we wstępie. W części pierwszej (Eksperyment I) analizowano zmiany liczebności, biomasy i produkcji kokonów *E.fetida* i *D.veneta* w populacjach "pełnych" i "niepełnych". Podstawowe cechy populacji obu gatunków po roku hodowli zostały przedstawione w Tab. 10. Pozwala to na porównanie głównych parametrów rozwojowych obu gatunków w kontekście potencjalnego ich wykorzystania do produkcji wermikompostów.

Wybrane właściwości fizyczno-chemiczne, w tym ogólną zawartość 14 pierwiastków w kompostach wytworzonych przez dżdżownice przedstawiono w Tab. 11. Lepszą miarą oceny żyzności i potencjalnej użyteczności przetworzonego podłoża torfowego byłaby raczej analiza koncentracji pierwiastków w formie przyswajalnej dla roślin a nie ich ogólna zawartość. Pośrednio takich informacji dostarcza także analiza konduktometryczna - istotnie wyższą przewodność wykazują wermikomposty wytworzone przez *E.fetida* w porównaniu do podobnych wytworzonych przez *D.veneta* (Tab.11).

Zawartość biogenów i mikroelementów w pojemnikach hodowlanych z dżdżownicami wzrasta przeważnie 2-3-krotnie w porównaniu do wyjściowego podłoża hodowlanego nazywanego w tabeli "warstwą stratyfikacyjną". Równocześnie, koncentracja wszystkich analizowanych pierwiastków, z wyjątkiem cynku jest wyższa w kompoście wytworzonym przez *D.veneta* w porównaniu do analogicznego w pojemnikach z *E.fetida*. Nawet jeśli część różnic jest nieistotna statystycznie (Tab.11), to utrzymująca się tak wyraźna tendencja jednak wymaga wyjaśnień i komentarza.

Doktorantka często używa takich sformułowań, jak "średnia suma biomasy" na ogół naprzemiennie z poprawnym określeniem "średnia biomasa". Jeśli zsumujemy biomasę

dżdżownic z trzech pojemników i podzielimy ją przez ich liczbę to otrzymamy średnią biomasa/pojemnik a nie średnią sumę biomasy.

Pewną niezręcznością jest również używanie terminu "populacja celomocytów". W naukach biologicznych termin populacja ma ściśle zdefiniowane znaczenie i określone cechy. Zespół komórek płynu celomatycznego lub nawet komórki tkanek płynnych kręgowców w żadnym razie nie mają właściwości populacji w sensie biologicznym.

Badane gatunki dżdżownic wykazują odmienne reakcje na okresowe drażnienie prądem stałym 4.5 V. W rocznym cyklu badań populacji *E.fetida* nie stwierdza się istotnych różnic w zagęszczeniu, biomase i ciężarze osobników pobudzanych prądem w porównaniu do populacji kontrolnej. Natomiast wysoką wrażliwość na stres wykazują populacje *D.veneta*. U tego gatunku stwierdzono obniżenie średniej liczebności, biomasy i liczby składanych kokonów. Spodziewałem się, że takie zbiorcze porównanie wybranych parametrów badanych populacji dżdżownic poddawanych szokowi elektrycznemu znajdę w tabeli podsumowującej analogicznie, jak to było w badaniach wcześniejszych (np. Tab. 10). Niestety, w Tab. 18 przedstawione są jedynie niewiele mówiące wartości F i p wraz z odsyłaczami do aneksu.

Istotnym osiągnięciem pracy jest eksperymentalne ustalenie dopuszczalnych stężeń substancji znieczulających, prokainy i lidokainy w odwracalnym unieruchamianiu dżdżownic do celów laboratoryjnych. Tu także uwidaczniają się różnicowania wrażliwości testowanych gatunków, *E.fetida* i *D.veneta*. Duże różnice w budowie i fizjologii pierścieni w porównaniu z kręgowcami takie, jak odmienność systemów neuromotorycznych, osmoregulacyjnych oraz pewna integralność poszczególnych metamerów wymagają kontynuacji tego typu badań.

Dyskusja rezultatów badań na tle literatury

Końcowa część pracy wraz z wnioskami i spisem literatury obejmuje ok. 40 stron maszynopisu. Wśród blisko 300 pozycji literatury większość to prace z ostatnich 10-15 lat. Bardzo rzadko przytaczane są podręczniki lub opracowania zbiorcze. Dyskusja jest ściśle podporządkowana głównym celom badań zarysowanym w części wstępnej. Doktorantka swobodnie porusza się w zróżnicowanej tematycznie literaturze i umiejętnie przyporządkowuje cytowane badania do aktualnie omawianych zagadnień i problemów. Dyskusja i pozostałe rozdziały pracy napisane bardzo dobrym i klarownym językiem polskim. Wnioski z elementami podsumowania wyważone, zredagowane z odpowiednią ostrożnością i uzasadnione wynikami badań. Cała praca cechuje się wysoką starannością i poprawnością wykonania.

Biorąc pod uwagę bezsporne osiągnięcia pracy, również te o potencjalnie dużym znaczeniu użytkowym, bardzo szeroki zakres przeprowadzonych badań eksperymentalnych oraz poprawną interpretację uzyskanych wyników stwierdzam, że praca doktorska mgr Agnieszki Podolak-Machowskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Podolak-Machowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Grzegorz Makulec



Warszawa 3.11.2016 r.