

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt. "*Reakcje dżdżownic (Lumbricidae) na stres na poziomie populacyjnym i komórkowym*"

(autorka: mgr Agnieszka Podolak-Machowska)

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agnieszki Podolak-Machowskiej przygotowana została w Katedrze Biologicznych Podstaw Rolnictwa i Edukacji Środowiskowej Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Kosteckiej oraz dr hab. Anny Rożen z Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Praca została zrealizowana przy pomocy środków z grantów badawczych przyznanych na lata 2013-2015 (dotacja celowa na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich finansowanych w wewnętrznym trybie konkursowym).

Rozprawa, której tekst liczy 208 str., składa się z 8 rozdziałów: "Wstęp", "Cele pracy", "Przegląd piśmiennictwa", "Materiał i metody badań", "Wyniki badań", "Dyskusja", "Wnioski", "Bibliografia". Do rozprawy dołączono streszczenie w języku angielskim oraz "Aneks", zawierający wyniki analizy statystycznej (zestawienie efektów).

We "Wstępie" Autorka zwróciła uwagę na rozwój nowych badań nad *Lumbricidae*, które stanowią nowy model doświadczalny w badaniach skażenia środowiska, głównie w ekotoksykologii gleb ze względu na dużą wrażliwość tych zwierząt na stres środowiskowy. Mogą one być bowiem wykorzystywane jako biowskaźniki przy badaniu zanieczyszczenia gleb m.in. ksenobiotykami na różnych poziomach, w tym na poziomie celomocytów mających udział w procesach odpornościowych tych zwierząt.

W rozdziale "Cele pracy" Autorka, nawiązując wprost do określonej we "Wstępie" problematyki badań, wyraźnie określiła postawiony przez siebie cel badawczy rozprawy doktorskiej. Celem tym było eksperymentalne określenie reakcji dżdżownic na stres, w tym:

- przedstawienie wybranych cech populacji gatunków *Eisenia fetida* (Sav.) i *Dendrobaena veneta* (Rosa) w cyklu rocznym (eksperyment I),
- określenie wpływu regularnego czynnika stresowego (za stres uznano oddziaływanie prądu elektrycznego o napięciu 4,5 V) na wybrane cechy badanych populacji wybranych do badań gatunków *Lumbricidae* oraz na ich celomocyty (eksperyment II).

- określenie wpływu prokainy i lidokainy na badane gatunki *Lumbricidae* pod kątem znalezienia stężeń toksycznych - LC_{05} , LC_{50} , LC_{95} (za stres uznano oddziaływanie wybranych anestetyków lokalnych) (eksperyment III).
- znalezienie stężeń prokainy i lidokainy, które są bezpieczne oraz skuteczne w odwracalnym znieczuleniu dżdżownic (eksperyment III).

Autorka założyła, że szczegółowa znajomość cech populacji gatunków *Lumbricidae* stosowanych w wermikompostowaniu ma duże znaczenie praktyczne np. przy doborze gatunku dla wermikultury i produkcji wermikompostu. Podobnie założono, że wyniki badań uzyskane w trakcie eksperymentu III mogą mieć znaczenie zarówno przy wyborze właściwego środka do unieruchamiania osobników *Lumbricidae* przy podejmowaniu badań tego wymagających, jak i być może okazać się przydatne dla innego praktycznego zastosowania tych zwierząt, związanego z możliwością zastosowania dżdżownic do wstępnego testowania różnych środków farmakologicznych.

Wstępnym teoretycznym rozdziałem przedstawiającym zagadnienia związane z problematyką rozprawy jest "Przegląd piśmiennictwa", dotyczący czterech zagadnień: nowego ujęcia wartościowania zasobów środowiska, gleby w środowisku, w tym występowania i roli *Lumbricidae* w ekosystemie glebowym, biomonitoringu z użyciem *Lumbricidae*, nowych perspektyw zastosowania *Lumbricidae* w wermikompostowaniu oraz testowaniu anestetyków.

Przedstawiając podstawowe informacje o nowym ujęciu wartościowania zasobów środowiska Autorka ograniczyła się tylko do podstawowych informacji dotyczących głównie świadczeń ekosystemów w aspekcie rozwoju zrównoważonego. Krytycznie jednak nie analizuje tej koncepcji, przedstawia tylko podstawową literaturę i informacje. Nie zwróciła uwagi na znaczenie decyzji politycznych i ich wpływu na środowisko. Brak w naszym kraju woli politycznej uniemożliwia wprowadzanie rozwoju zrównoważonego i retardacji. Deklaracje na ten temat, a nawet wyniki badań naukowych, praktycznie bez tego nic nie znaczą i są tylko pozorem działania. Sytuację zmieni tylko długotrwała praca organiczna.

Autorka przedstawiła podstawową charakterystykę gleby, której podstawowym atrybutem jest życie, w środowisku. Nie poruszyła zagadnienia wypadania gleb z produkcji rolnej w wyniku zaprzestania upraw i rozpoczęcia naturalnej sukcesji roślinności lub całkowitej zmiany funkcji terenów z glebami porolniczymi. Podnoszony przez Autorkę problem wzrostu pozytywnego przekształcenia gruntów zdegradowanych i zdewastowanych w obszar zagospodarowane nie zawsze musi być jednak pozytywny. Mogą bowiem powstać zabudowania i skomplikowana naziemna i podziemna infrastruktura techniczna, następuje

rozlewanie się miast, na terenach urbanizujących się powstają coraz większe powierzchnie uszczelnionych gruntów, następuje obniżenie poziomu wód gruntowych i przesuszenie. Gleby nie tworzą - jak pisze Autorka - przestrzeni dla różnych struktur technicznych i przemysłowych oraz budowli mieszkalnych. Nie tylko nie tworzą lecz w wyniku działalności inwestycyjnej ulegają na ogół bezpowrotnemu zniszczeniu.

Wiedza o różnorodności gatunkowej naszego kraju jest ciągle bardzo ograniczona. I będzie jeszcze bardziej, bowiem nie kształci się nowych specjalistów znających poszczególne grupy zwierząt, zwłaszcza bezkręgowców. Przedstawiając *Lumbricidae* jako część ekosystemu glebowego Autorka podaje krótką charakterystykę roli tych zwierząt w glebie. Zasiedlają one jednak nie tylko ekosystemy typowo lądowe, ale także częściowo związane z wodą; spotykane są nawet w wodach płynących lub w strefie pobraża jezior. Wyraźnie podkreśla, że ze względu na dużą wrażliwość na stres środowiskowy *Lumbricidae* uważane są za dobre organizmy wykorzystywane przy ocenie skażeń środowiska. Słusznie uważa, podobnie jak wielu innych autorów, że na podstawie znajomości biologii tych zwierząt i różnorodności fauny towarzyszącej ich populacjom możliwe jest monitorowanie stanu gleb zdegradowanych i rekultywowanych. *Lumbricidae* stosowane są w ocenie jakości gleby. Dotyczy to badań wpływu zanieczyszczeń na cechy morfologiczne i rozrodczość tych zwierząt, a także analiz niektórych cech komórek odpornościowych. Przedstawiła podstawowe informacje o komórkach odpornościowych oraz różne metody badań, np. ekspozycję na substancje chemiczne i testy bibulowe. Możliwa jest ocena wpływu substancji na osobniki różnych gatunków *Lumbricidae* na różnym poziomie oraz analiza śmiertelności w warunkach polowych i testów laboratoryjnych. Wyraźnie podkreśliła, że *Lumbricidae* jako zwierzęta pospolite, łatwe w hodowli i intensywnie rozmnażające się mogą stanowić modelowe organizmy w badaniach ekotoksykologicznych. Dlatego różne gatunki, chociaż odznaczające się odmienną reakcją na czynniki chemiczne, mogą być używane jako bioindykatory skażenia środowiska. Nie podała jednak informacji o miarach oceny takiej bioindykacji w oparciu o znajomość fauny *Lumbricidae*.

Stosunkowo nowymi perspektywami zastosowania *Lumbricidae* jest wermikompostowanie, produkcja biomasy wykorzystywanej dla celów paszowych oraz testowanie anestetyków. Już we wcześniejszych pracach (Podolak-Machowska i in. 2012, 2013), których jest współautorką, zwróciła uwagę, że *Lumbricidae* spełniają wymagania stawiane zwierzętom laboratoryjnym. Stanowią dobrą alternatywą badań na kręgowcach, mogą znaleźć zastosowanie również jako pierwszy etap testowania środków znieczulających. Autorka słusznie zwróciła uwagę na istniejące w tym przypadku problemy

natury etycznej oraz wątpliwość w interpretacji wyników tych badań w odniesieniu do kręgowców, w tym do człowieka.

Szczegółowy opis założonych doświadczeń laboratoryjnych Autorka zamieściła w rozdziale "Materiał i metody badań". Prowadzone w latach 2011-2015 badania wykonano w warunkach laboratoryjnych Katedry Biologicznych Podstaw Rolnictwa i Edukacji Środowiskowej Uniwersytetu Rzeszowskiego. Do badań zastosowano dwa gatunki *Lumbricidae*: *Eisenia fetida* (Sav.) i *Dendrobaena veneta* (Rosa). Taksonomiczne oznaczenie badanych gatunków jest bez wątpienia poprawne i nie budzi jakichkolwiek wątpliwości. Wskazuje na to m.in. zestawienie wybrane cech taksonomicznych badanych gatunków *Lumbricidae*. Poprawnie określając systematyczną pozycję wybranych do badań gatunków można było - wskazując rząd *Haplotaxida* - określić także podrząd, w tym przypadku *Lumbricina*. Rząd *Haplotaxida* jest dość zróżnicowany i podział na podrzędy (*Haplotaxina*, *Moniligastrina*, *Lumbricina*, *Tubificina*) jest wskazany.

Metoda założonej hodowli gatunków *Lumbricidae* została przez Autorkę przedstawiona i praktycznie zrealizowana prawidłowo. Hodowle gatunków pozyskanych z hodowli komercyjnych prowadzono w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, głównie ze względu na odpowiednią temperaturę, wilgotność i stałe oświetlenie. Nie budzi żadnych zastrzeżeń wykorzystane do hodowli podłoże (Kronen Universallerde). Autorka przyjęła podane przez producenta parametry pH oraz zawartości azotu, fosforu i potasu nie przeprowadzając dodatkowych analiz chemicznych podłoża. Brak jest danych o zawartości w podłożu substancji organicznych. Ponieważ jest to podłoże mające zastosowanie w ogrodnictwie, dlatego bez wątpienia zawartość substancji organicznych była bardzo wysoka. Jednoznacznie nie określono, jak w trakcie hodowli zmieniał się skład podłoża. Jednak analizie poddawano skład wermikompostu uzyskiwanego w doświadczeniu I, ściślej IA. W tym przypadku Autorka podała zastosowane metody analiz wermikompostu i wykorzystywaną aparaturę. Autorka przedstawiła także zastosowane w badaniach odczynniki chemiczne, podając ich charakterystykę i producenta.

Metodyczna część rozprawy zawiera także szczegółowy opis eksperymentów. Chce podkreślić, że eksperymenty prowadzone były przez długi okres czasu (dwa lata, a każde z doświadczeń przez jeden rok). Opisy eksperymentów są dobrze przygotowane, przejrzyste, jednoznaczne, także w zakresie zadawanej karmy (pochodzenie, skład, ilość, sposób podawania). Określano biomasę żywych osobników, po ich uprzednim zewnętrznym oczyszczeniu. Do wyliczenia wartości biomasy nie stosowano współczynników uwzględniających wypełnienie przewodu pokarmowego. Jednak w opisie eksperymentu II

jest uwaga, że przed określeniem masy ciała osobniki były pozbawiane zawartości jelita poprzez delikatne masowanie. Nie jest to jednoznaczne z tym, że wszystkie osobniki były w ten sposób traktowane. Ze względu na różnice wielkości osobników młodych i dojrzałych możliwe było to zapewne tylko u osobników stosunkowo dużych. Opis eksperymentu II zawiera także szczegółowe dane na temat sposobu uzyskiwania zawiesiny celomocytów do dalszych badań komórek (amebocyty, eleocyty). W opisie eksperymentu III podano także sposób wybudzania osobników *Lumbricidae* po poddaniu działaniu prokainy i lidokainy. Istotne dla wiarygodności wyników uzyskanych w tym doświadczeniu jest to, że nie stwierdzono śmiertelności zwierząt w grupach kontrolnych podczas żadnego z powtórzeń. W eksperymencie tym obserwowano także występowanie zmian morfologicznych oraz ruchliwości osobników poddanych działaniu prokainy i lidokainy.

Dane liczbowe uzyskane w trakcie badań opracowano statystycznie wykorzystując program STATISTICA. Stosowano także testy istotności (testy: W Shapiro-Wilk'a oraz Browna-Forsyth'a).

W rozdziale "Wyniki badań" Autorka bardzo szczegółowo przedstawiła wyniki poszczególnych eksperymentów:

- eksperyment I - dynamika populacji *Eisenia fetida* (Sav.) i *Dendrobaena veneta* (Rosa) - analiza liczebności i biomasy populacji pełnych i niepełnych; skład chemiczny otrzymanych wermikompostów;
- eksperyment II - oddziaływanie stresu na populacje *Eisenia fetida* (Sav.) i *Dendrobaena veneta* (Rosa) - analiza liczebności i biomasy populacji pełnych i niepełnych; wpływ na celomocyty;
- eksperyment III - reakcje *Eisenia fetida* (Sav.) i *Dendrobaena veneta* (Rosa) na działanie prokainy i lidokainy w testach bibułowych oraz próby unieruchamiania osobników przy użyciu prokainy i lidokainy;

Wszystkie dane z eksperymentów w prawidłowy sposób zostały porównane z populacjami grup kontrolnych. W takiej sytuacji nie może być mowy o pomyłkach. Przeprowadzone każdorazowo testy potwierdziły istotność uzyskanych danych. Niezręczne jest sformułowanie tytułu podrozdziału 5.2.2. "Oddziaływanie stresu elektrycznego (4,5V) na populacje celomocytów *E. fetida*". Nie ma "populacji celomocytów", są jedynie populacje osobników *Lumbricidae*. Proponuję tytuł następujący: "Oddziaływanie stresu elektrycznego (4,5V) na celomocyty *E. fetida*". Chcę jednak podkreślić niezwykle staranne opracowanie wyników przeprowadzonych eksperymentów. Wszystkie zostały poddane analizie statystycznej, prezentowane są w rozprawie w postaci licznych przejrzystych wykresów, tabel, a także

wykonanych przez Autorkę licznych kolorowych fotografii dokumentujących poszczególne etapy eksperymentów, w tym. także obrazujących zmiany morfologiczne dżdżownic po ekspozycji na stężenia badanych anestetyków.

Bardzo obszernym rozdziałem jest "Dyskusja". W wielkim uznaniem przyjąłem rozpoczęcie tego rozdziału od przywołania, a właściwie od przypomnienia dzieła Karola Darwina pt. *"The Formation of Vegetable Mould Through the Action with Observation on Their Habits"* poświęconego *Lumbricidae* i roli tych zwierząt w glebie.

Badania dostarczyły wielu interesujących obserwacji dotyczących biologii populacji gatunków wykorzystywanych w procesach kompostowania.

Rozprawa przedstawia szereg nowych danych dotyczących biologii, rozwoju, zmienności osobniczej, intensywności rozmnażania (długość procesu dojrzewania, liczebność składanych kokonów, masa ciała, wpływ temperatury na modyfikację cykli życiowych). Znajdują one nie tylko potwierdzenie w dotychczasowej literaturze, ale istniejące na ten temat dane jeszcze bardziej uszczegóławiają. Bardzo interesujące są informacje na temat długości życia *Lumbricidae*. Autorka przedstawiła także swoje uwagi na temat strategii życiowej *Lumbricidae* (strategie: K , r). Chociaż skłania się - opierając się na wcześniejszych danych literaturowych - do stwierdzenia, że w przypadku badanych gatunków jest to strategia r , to jednak sprawy jednoznacznie nie rozwiązuje. I słusznie, bowiem strategie te nie były przedmiotem badań Autorki. Tak naprawdę nie wiadomo do końca jakie w przypadku *Lumbricidae* strategie mają miejsce. Hodowle eksperymentalne dotyczą tylko nielicznych gatunków. Brak jest szczegółowych danych na temat cykli rozwojowych większości gatunków *Lumbricidae*, zwłaszcza występujących w głębokich warstwach gleby w różnych warunkach naturalnych. Nowymi danymi, nie mającymi jak dotychczas porównania z danymi literaturowymi, są obserwacje na temat wpływu prądu elektrycznego na osobniki, w tym zmiany morfologiczne i anatomiczne. Praktyczne zastosowanie w różnych technikach laboratoryjnych mogą mieć dane uzyskane w trakcie badań nad poddawaniem osobników *Lumbricidae* "znieczuleniu" anestetykami. Stosowana przez Autorkę metoda pozyskiwania celomocytów oraz metoda "znieczulania" są wyraźnie doskonalsze od dotychczasowych. Nie podzielam jednak w pełni stanowiska, że odkrywanie nowych technik znieczulania *Lumbricidae* ma istotne znaczenie dla poprawy dobrostanu zwierząt laboratoryjnych. Przeniesienie wyników tych badań na poziom kręgowców niekoniecznie może być właściwe a późniejsze wnioskowanie wręcz błędne. Obecnie na pewno nie będą to rutynowe procedury związane z badaniami laboratoryjnymi. Całkowicie słuszne są natomiast stwierdzenia, że prowadzenie badań laboratoryjnych na kręgowcach należy ograniczyć.

Przytoczone przez Autorkę "Wnioski" jednoznacznie wskazują, że osiągnęła ona założone cele badawcze w przedstawionych hipotezach. Są one jednoznaczną odpowiedzią na postawione pytania dotyczące:

- analizy cyklu rocznego rozwoju średniej populacji dżdżownic *Eisenia fetida* (Sav.) i *Dendrobaena veneta* (Rosa) (liczebność, biomasa, rozrodczość),
- składu chemicznego wermikompostu powstałego przy udziale obu gatunków
- reakcji osobników *Lumbricidae* na stres wywołany przez stymulację prądem elektrycznym oraz kontakt z anestetykami.

Stwierdzono, że skład chemiczny wermikompostów wykazał istotne różnice w zawartości potasu, sodu, magnezu, kadmu i chromu. Zasobność w azot, fosfor, wapń, ołów, cynk, miedź, nikiel, mangan, żelazo była natomiast bardzo podobna. Obserwowano występowanie wyraźnego zróżnicowania reakcji osobników *Lumbricidae* na stres na poziomie populacyjnym. Stres ujawniał się także na poziomie komórkowym, na co wskazywało obniżanie się całkowitej liczby celomocytów i niższy procent eleocytów. Podobnie występowały zróżnicowane reakcje osobników *Lumbricidae* dżdżownic w kontakcie z anestetykami.

Cytowana literatura (rozdział "Bibliografia") liczy 296 pozycji, w tym cztery prace wykonane przez zespoły autorskie (po 4 i 6 autorów) z udziałem mgr Agnieszki Podolak-Machowskiej; we wszystkich tych pracach jest Ona pierwszym, autorem. Przeważająca większość cytowanych prac związanych jest z badaniami *Lumbricidae*, cytowane są także prace o bardziej ogólnych problemach ekologicznych, o zrównoważonym rozwoju i retardacji oraz różne podręczniki.

*

Zgodnie z przepisem art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882, tekst jednolity z późn. zm.) rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Moim zdaniem przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agnieszki Podolak-Machowskiej wszystkie te walory zawiera. W związku z powyższym, jako recenzent rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Podolak-Machowskiej pt. "*Reakcja dżdżownic (Lumbricidae) na stres na poziomie populacyjnym i komórkowym*", wyznaczony uchwałą Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie z dnia 7 lipca 2016 r. (pismo Dziekana Wydziału Biologiczno-Rolniczego z dnia 26 lipca 2016 r., znak DBR-520-

58/2016), uważam że przedstawiona rozprawa jest dowodem na bardzo dobre opanowanie przez Autorkę warsztatu naukowego. Przedstawiona rozprawa odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim, co zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852, tekst jednolity z późn. zm.) kwalifikuje mgr Agnieszkę Podolak-Machowską do nadania stopnia naukowego doktora nauk biologicznych- biologia. Zgodnie z art. 14 ust. 2 cytowanej wyżej ustawy jako recenzent wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Agnieszkę Podolak-Machowską i dopuszczenie jej do publicznej obrony.

Podkreślając jednocześnie ogromny wkład pracy i wagę podnoszonych problemów proponuję wyróżnić ocenianą pracę doktorską.



dr hab. Krzysztof Kasprzak, prof. nadzw.

Poznań, dnia 27 września 2016 r.