

Prof. dr hab. Anna Stefanowicz
Instytut Botaniki im. W. Szafera
Polskiej Akademii Nauk
Lubicz 46
31-512 Kraków

Kraków, 7.08.2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Brudzińskiej-Kosior „Zróżnicowanie siedliskowe, biogeochemia i struktura genetyczna wybranych populacji *Centaurium erythraea* Rafn (Gentianaceae) z południowo-zachodniej Polski” wykonanej na Wydziale Nauk Biologicznych w Zakładzie Botaniki pod kierunkiem dr hab. Anny Jakubskiej-Busse, prof. UW

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej, prof. dr hab. inż. Marcina Kadeja, z dnia 6 czerwca 2024 roku oraz Uchwała nr 45/2022 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 21 kwietnia 2022 roku w sprawie wyznaczenia recenzentów w przewodzie doktorskim mgr Anny Brudzińskiej-Kosior.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim (streszczenie w języku polskim i angielskim). Rozprawa liczy 140 stron, w tym 33 tabele oraz 14 rycin, których spis znajduje się w końcowej części pracy. Obiektem badań jest centuria pospolita (*Centaurium erythraea* Rafn) – gatunek stanowiący cenny surowiec zielarski, a jednocześnie objęty obecnie częściową ochroną gatunkową ze względu na zmniejszenie liczebności populacji wynikającą z pozyskania rośliny przez przemysł zielarski, a także z degradacji siedlisk. Rozdział 1, czyli **Wstęp** pracy zawiera różnorodne wątki, czasem dość przemieszane, przez co jest nieco chaotyczny. W jego pierwszej części mowa jest o zachowaniu rodzimej flory w kontekście antropopresji, następnie Doktorantka podkreśla, że nie prowadzono dotychczas „dokładnych” badań biologii, biogeochemii i warunków siedliskowych centurii pospolitej. Co Doktorantka ma na myśli, pisząc o „dokładnych” badaniach? Charakterystyka obiektu badawczego przedstawiona w rozprawie pozwala wnosić, że sporo już wiadomo. W dalszej części wstępu mowa o biomonitoringu i bioindykacji, po czym następuje obszerny opis jednego z badanych zanieczyszczeń – polibromowanych eterów difenylowych (PBDE). Autorka podkreśla, że są to związki „szczególnie groźne” dla zwierząt i ludzi – co to znaczy? W porównaniu z czym? Czy z pozostałymi badanymi związkami (WWA, PCB) oraz pierwiastkami? Dlaczego tych związków i pierwiastków nie opisano we wstępie równie obszernie jak PBDE? W kolejnej części wstępu obecne jest nawiązanie do wykorzystania ziół w celach leczniczych, a następnie Doktorantka przechodzi do systematyki rodzaju *Centaurium* oraz zmienności fenotypowej i genetycznej gatunku. Trudno odgadnąć, co skłoniło Doktorantkę do wyboru centurii pospolitej jako obiektu badań – czy chęć poznania częściowo chronionej rośliny i jej siedliska w celu zwiększenia skuteczności ochrony czy analiza jakości chemicznej rośliny jako surowca zielarskiego (we wstępie mowa jest o „bezpieczeństwie konsumentów”). Wydaje się, że trudno połączyć intensywne pozyskanie rośliny z populacji naturalnych (10 ton suszu rocznie) z jej ochroną. Przy okazji nasuwa się pytanie czy nie lepiej byłoby pozyskiwać roślinę z upraw na terenach oddalonych od emitorów zanieczyszczeń – wydaje się, że rozwiązałoby to zarówno problem kurczących się populacji naturalnych, jak i zanieczyszczenia surowca zbieranego w dość przypadkowych miejscach. W drugiej części pracy

opisane są **cele badawcze**, które dotyczą oceny zróżnicowania siedlisk gatunku pod względem chemicznym – obejmującym pierwiastki, w tym metale ciężkie, a także trwałe zanieczyszczenia organiczne oraz ocenę zdolności akumulacji zanieczyszczeń przez centurię. Ponadto, zbadano zróżnicowanie populacji centurii pod względem cech osobniczych i grupowych oraz przeanalizowano strukturę genetyczną populacji w celu ustalenia pokrewieństwa między nimi. Czytelnik czuje się nieco skonfundowany, gdyż w celach pracy wymieniono tylko część właściwości gleby, które były badane, tj. część pierwiastków oraz pH, a dopiero w części metodycznej okazuje się, że mierzono również Ca, K, P oraz N, które są kluczowe dla wzrostu roślin. Niestety, nie zmierzono takich parametrów gleby jak skład granulometryczny oraz zawartość materii organicznej (C organicznego), które powiązane są ze statusem troficznym gleby, zdolnością do utrzymywania wody, mikrobiomem glebowym, wreszcie z biodostępnością metali ciężkich i ich akumulacją przez rośliny, a zatem mogą mieć znaczenie dla wzrostu roślin oraz akumulacji zanieczyszczeń w ich tkankach. Drugie pytanie dotyczy pierwiastków wybranych do analiz, zarówno w przypadku gleby, jak i materiału roślinnego – na jakiej podstawie wybrano pierwiastki? W jakim stopniu pierwiastki analizowane w centurii takie jak antymon (Sb), hafn (Hf) czy lantan (La) oraz inne uwzględniane rzadziej w badaniach są problemem środowiskowym i wpływają na zanieczyszczenie materiału roślinnego? Trzecia część pracy zawiera **hipotezy badawcze**. W przypadku tej części również nasuwa się kilka pytań – dlaczego H1, mówiąca o tym, że „wielkość rozet roślin juwenilnych *Centaurea erythraea* uwarunkowana jest zawartością wybranych makro i mikroelementów w glebie” nie jest częścią bardzo podobnie brzmiącej hipotezy, w której mowa ogólnie o „parametrach biometrycznych” tego gatunku? Skąd wiadomo, że to badane pierwiastki, a nie wspomniane wcześniej cechy gleby, jak skład granulometryczny lub zawartość materii organicznej, a także form dostępnych N (N amonowy i azotanowy) i P, które nie były mierzone wpływa na cechy biometryczne gatunku? Szczególnie, że stanowiska badawcze leżą względnie daleko od siebie i mogą być zróżnicowane nie tylko pod względem badanych pierwiastków i zanieczyszczeń organicznych, o czym wspomina Doktorantka charakteryzując glebę i klimat województw dolnośląskiego i opolskiego. Dopiero z rozdziału 6.12 (Analizy statystyczne) czytelnik dowiaduje się, że wydzielono grupy stanowisk – jedną z obszarów bardziej zanieczyszczonych (MP) oraz mniej zanieczyszczonych (LP). Czy dobrze rozumiem, że do obszarów czystszych zaliczono tylko 1 stanowisko, a do obszarów zanieczyszczonych aż 9? To nie jest jasne, mimo że jest to kluczowa informacja w kontekście porównania tych dwóch grup po względem zanieczyszczeń. Należy przy tym podkreślić, że obszary wiejskie również mogą być zanieczyszczone – jeśli mówimy o pestycydach, nadmiarze nawozów sztucznych, a co ważniejsze w kontekście badanych w pracy zanieczyszczeń – emisji z indywidualnych źródeł ogrzewania, wszelkiej maści kopcuchów, które w Polsce są bardzo dużym problemem. Dlatego można uznać, że podziału na grupy dokonano dość arbitralnie. Skąd wzięła się H3, w której mowa o świetle i kiełkowaniu, skoro o tym problemie nie wspomniano ani we wstępie, ani w celach pracy? Rozdział 4 zawiera dość obszerną **charakterystykę obiektu badawczego**, do którego nie mam większych zastrzeżeń, a Rozdział 5 charakterystykę **obszaru badań**. Praca w znacznej części dotyczy problemu zanieczyszczenia środowiska i to dwoma grupami zanieczyszczeń (pierwiastki i zanieczyszczenia organiczne), więc tym, czego bardzo brakuje w opisie obszaru badań są źródła zanieczyszczenia. Co jest źródłem badanych zanieczyszczeń w regionie? Czy to źródła bardzo rozproszone czy ograniczone głównie do pewnego obszaru, np. przy zakładzie przemysłowym? W jaki sposób wytypowano „stanowiska zanieczyszczone”, o których mowa w hipotezach, czy też stanowisko „kontrolne”, o którym mowa na początku Rozdziału 6 **Materiał i metody**? Metodyka prac laboratoryjnych jest zasadniczo poprawna. Zastosowano ślepe próby oraz materiały referencyjne dla gleby i roślin w analizach pierwiastków i związków organicznych. Mam jednak kilka pytań i uwag. Dlaczego do analiz zebrano tylko liście centurii, skoro

we wcześniejszych rozdziałach wspomniano, że używane są całe rośliny, łącznie z korzeniem. Wiadomo, że większość gatunków roślin rosnących w terenie zanieczyszczonym akumuluje bardzo duże ilości metali ciężkich w częściach podziemnych. Może więc to właśnie korzenie należało zbadać w pierwszej kolejności? Dlaczego próby gleby suszono w 50 °C, a nie standardowo w 105 °C? Czy mierzono wszystkie rośliny w kwadracie 1 × 1 m? Jedna z kolumn w Tabeli 1 dotyczy różnic między wartościami uzyskanymi a certyfikowanymi – szczęśliwie nie są one tak duże, jak przedstawiono w Tabeli (około 100%). W rzeczywistości różnica, na przykład, dla Mn w glebie (506 vs 527 mg g⁻¹) to 4%, a nie 104%. W przypadku przedstawionych wartości zapewne należało zastosować określenie „odzysk”, a nie „różnica”. Dobrą praktyką jest również podawanie liczby prób (N), dla których wyliczono średnie i błędy lub odchylenia (niestety, nie opisano, które statystyki przedstawione są w tabelach, a zarówno tabele, jak i wykresy powinny spełniać kryterium samoobjaśnialności). Tego typu niedociągnięcia dotyczą wielu tabel prezentowanych w pracy. Dla Tabeli 2 nie wyliczono odzysków/różnic. Ponadto nie wiadomo, których materiałów referencyjnych dotyczą prezentowane wartości – zastosowano ich kilka. W całym tekście stosowane są zamiennie skróty PBDE oraz PDBE – należałoby to ujednolicić. Jaka była liczba nasion użytych w doświadczeniach opisanych Rozdziale 6.15? Mowa jest o 150, następnie o 500 (5 grup po 100 nasion), a potem znów o 150. **Analizy statystyczne** wydają się być w większości poprawne. W kontekście testowania hipotez z wykorzystaniem metod analizy wariancji, korelacji i regresji, martwi jednak fakt, że powtórzenia (N = 30) nie są niezależne, gdyż zbierano po 3 próby z każdego z 10 stanowisk. Nie jest jasne, które grupy porównywano testem ANOVA wspomnianym w opisie metod statystycznych. To powinno być jasno napisane. Test korelacji Pearsona służy do badania zależności między zmiennymi, jak słusznie zauważa Doktorantka. Jednak w kolejnym zdaniu następuje pomieszanie bytów i mowa jest o „różnicach między grupami”, do badania których służą techniki analizy wariancji, a nie korelacji. Ponadto analiza głównych składowych (PCA) jest analizą wielowymiarową wymagającą sporej liczebności próby. A. Stanisławski w podręczniku „Przystępny kurs statystyki” stwierdza, że „próba o liczebności 50 obserwacji to absolutne minimum”. W tym przypadku warunek ten nie jest spełniony. Doktorantka wyliczyła wskaźniki ryzyka zdrowotnego, co jest zaletą pracy. Jednak w przypadku wskaźnika „dzienne spożycie metalu” nie objaśniono skrótu BW ze wzoru. Zapewne jest to masa ciała. Czym w takim razie jest EF, a czym ED? Na jakiej podstawie wybrano pierwiastki do obliczeń wskaźnika ryzyka zdrowotnego? Czy jeśli w obliczeniach nie uwzględniono pewnych pierwiastków, np. As, Pb, Tl, to czy faktyczne ryzyko może być większe niż wyliczone? **Rozdział 7 Wyniki** oraz **8 Dyskusja** stanowią odrębne części pracy. Mimo tego w opisie wyników w wielu miejscach są obecne elementy dyskusji oraz cytacje literatury. Tematyka w rozdziale Wyniki jest przemieszana (pierwiastki w glebie – kiełkowanie – pomiary biometryczne – pierwiastki w roślinie – zanieczyszczenia organiczne w roślinie – genetyka rośliny). W mojej opinii układ podrozdziałów powinien być inny, lepiej pogrupowany tematycznie (chemia gleby – chemia rośliny – biologia rośliny – związek chemii z biologią), co ułatwiłoby odbiór pracy (w Dyskusji oraz Podsumowaniu układ tematyczny jest jeszcze inny). Opis wyników zaczyna się (str. 46) dość niejasną częścią dotyczącą stężeń pierwiastków w próbach gleby. Praca Markert (1992), która jest cytowana w tej części dotyczy rośliny referencyjnej („reference plant”) i nie znalazłam w niej cytowanych w rozprawie wartości dla gleby. Doktorantka pisze, że stężenia pierwiastków były wyższe, bądź niższe od zakresów referencyjnych, ale o które stężenia chodzi? W Tabeli 4 podane są stężenia minimalne, średnie i maksymalne. Stężenia średnie na ogół mieszczą się w cytowanych zakresach. Czy wartości te wyliczono dla wszystkich stanowisk, czy pominięto stanowisko kontrolne, o którym Doktorantka wspomina osobno? To jest niejasne. Niejasne jest również między jakimi grupami znaleziono istotne różnice dzięki zastosowaniu ANOVY. Moje wątpliwości budzi również zasadność prezentacji wyników pH dla poszczególnych stanowisk (str. 47).

W opisie wyników znajdują się także elementy opisu metodyki, których miejsce powinno być w rozdziale 6 (np. PCA, str. 47). Nie do końca podoba mi się interpretacja wyników PCA. Na przykład najwyższe ładunki w składowej 1 (> 0.9) mają K i Mg, a w drugiej kolejności są P oraz Ca (> 0.7). W takiej sytuacji pierwiastki te są najpewniej skorelowane również między sobą. Napisałabym więc, że stanowisko 10 zostało wyróżnione, ponieważ charakteryzuje się wysoką zawartością K, Mg, Ca oraz P, a nie tylko Ca, jak pisze Doktorantka. Powinno się to zgadzać ze stanem faktycznym, jeśli spojrzymy na surowe dane, tj. pierwiastki, a nie tylko na składowe i ich ładunki. Z kolei na rycinie 6 wyodrębnione są stanowiska 5, 6 oraz 7, dla których interpretacja zgadza się z wynikami z PCA, odstają również stanowiska 1 i 2 (co widać na rycinie), ale na pewno nie 10, jak zaznaczono. W części wyników dotyczących kiełkowania i pomiarów roślin z niewiadomego powodu przedstawiono jedynie ograniczone statystyki, tj. średnie bez miar zmienności, brakuje testów statystycznych lub są one nieprawidłowe (test t zamiast ANOVA i test post-hoc do porównania 3 grup). Jeśli chodzi o opis wyników stężeń trwałych zanieczyszczeń organicznych, niejasny jest fragment zaczynający się w drugim akapicie na str. 79. O jakich zależnościach mowa? I co znaczy, że zależności istotne statystycznie były „wyższe”? Jeśli chodzi o precyzję wypowiedzi, zapewne lepiej jest również mówić o różnicach istotnych statystycznie, niż o wynikach istotnych statystycznie (Tabela 27, 28, 29). Poziomy zanieczyszczeń organicznych porównano pomiędzy obszarami wiejskimi a przemysłowymi/miejskimi. Dlaczego tej operacji nie wykonano dla pierwiastków? Przy okazji dodam, że czytelnik kończąc czytać rozdział nadal nie jest pewny, które stanowiska zaliczono do każdej z grup i na jakiej podstawie. To wymaga wyjaśnienia. **Bibliografia** jest obfita i obejmuje 244 pozycje, w zdecydowanej większości anglojęzyczne, jak również źródła internetowe. Formatowanie bibliografii jest dość dowolne w kwestii używania skrótów i pełnych nazw czasopism. W całej rozprawie obecne są drobne błędy językowe, w wielu miejscach brakuje precyzji wypowiedzi.

Mimo powyższych uwag, wyniki przedstawione w rozprawie uważam za wartościowe. Za najistotniejsze uznaję rozbudowaną analizę roślin pod względem chemicznym (zarówno pierwiastki, jak i zanieczyszczenia organiczne), co pozwala wnioskować zarówno o jakości materiału zielarskiego, jak i, w pewnym stopniu, o ogólnym stanie środowiska na badanym obszarze, a także ocenę stanu populacji centurii pospolitej. Uderzającym wynikiem jest drastyczne pogarszanie się tego stanu, łącznie z zanikaniem gatunku na niektórych stanowiskach. Taki wynik prosiłby się o szerszy komentarz Doktorantki, gdyż zabrakło go w Dyskusji. Jakie mogą być przyczyny takiego stanu rzeczy? Czy wiadomo, czy roślina była pozyskiwana na badanych stanowiskach do celów zielarskich? Czy wiadomo, jakie są obecnie losy gatunku na tych stanowiskach?

W mojej opinii oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Anny Brudzińskiej-Kosior do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Anna Stefanowicz