

prof. dr hab. inż. Janina Kaniuczak
Katedra Gleboznawstwa, Chemii Środowiska i Hydrologii
Wydział Biologiczno-Rolniczy
Uniwersytet Rzeszowski

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marleny Grabowskiej-Wrzesińskiej pt. „Dynamika zmian zawartości selenu w wybranych glebach uprawnych na tle ich aktywności dehydrogenazowej”.

Recenzję przygotowano na zlecenie Pana Dziekana Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy prof. dr hab. inż. Jacka Długosza.

Ogólna charakterystyka

Rozprawa doktorska mgr inż. Marleny Grabowskiej-Wrzesińskiej pt. „Dynamika zmian zawartości selenu w wybranych glebach uprawnych na tle ich aktywności dehydrogenazowej” została wykonana w Zakładzie Biochemii na Wydziale Rolnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy. Promotorem rozprawy jest Pani dr hab. inż. Katarzyna Borowska, prof. nadzw. UTP.

Rozprawa została wydana w formie monografii, zawierającej 141 stron, w tym 32 szczegółowe tabele, jako załączniki na końcu pracy, 28 tabel zbiorczych w tekście pracy, 18 rysunków, streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca została podzielona na 6 rozdziałów, a w ich obrębie wyróżniono 25 podrozdziałów I i II-go rzędu. Są to następujące rozdziały: 1. Wstęp; 2. Przegląd literatury; 3. Materiał i metody; 4. Wyniki badań; 5. Dyskusja wyników; 6. Wnioski i (poza numeracją) Literatura. Literatura liczy 221 pozycji bibliograficznych w języku polskim (70) i angielskim (151). Wydzielenie podrozdziałów w obrębie większości rozdziałów ułatwiło znacznie studiowanie pracy. Układ pracy jest typowy jak w rozprawach doktorskich.

Tematyka pracy

Rozprawa doktorska jest ukierunkowana na określenie dynamiki zmian zawartości selenu i jego frakcji chemicznych w wybranych glebach uprawnych tj: czarnych ziemiach i pyłowych oraz w czarnych ziemiach pod łąkami. Ważnym problemem badawczym jest również określenie mobilności tego pierwiastka w środowisku glebowym i dostępności dla roślin. Zmiany te analizowano w latach badań i okresach sezonów wegetacyjnych z uwzględnieniem aktywności dehydrogenaz i badaniem ich wpływu na mobilność i dostępność selenu dla roślin. Zaprezentowane w rozprawie problemy badawcze mają duże znaczenie poznawcze, jak również aplikacyjne, tym bardziej, że dotyczą pierwiastka śladowego - mikroelementu jakim jest selen, a którego biogeochemia jest dość skomplikowana. Oznaczenie jego specjacji chemicznych było dużym wyzwaniem badawczym Doktorantki. Gleby polskie nie są gruntownie przebadane pod względem zawartości selenu, a w wielu regionach występuje deficyt tego pierwiastka. Dotychczasowy stan wiedzy na temat selenu wskazuje na jego dużą

rolę w procesach biochemicznych organizmu człowieka i zwierząt oraz w profilaktyce wielu chorób. Nowatorskim podejściem w tej pracy było ustalenie zależności pomiędzy zawartością różnych form selenu a aktywnością dehydrogenaz w glebach uprawnych (czarne ziemie, gleby płowe) i w czarnych ziemiach pod łąkami w kilku terminach dwóch sezonów wegetacyjnych i po ich zakończeniu. W badaniach uwzględniono także czynniki kształtujące zawartość selenu i aktywność dehydrogenaz tj. kilkanaście gatunków uprawnych roślin, nawożenie naturalne, organiczne i mineralne, w tym nawożenie azotem. Podjęta tematyka badawcza dotyczy ważnego problemu naukowego nad rozpoznaniem różnych form chemicznych selenu w glebach uprawnych i pod łąkami w aspekcie jego mobilności i dostępności dla roślin.

Wartość naukowa pracy

Rozprawa doktorska rozpoczyna się krótkim wprowadzeniem w obszar problematyki badawczej, które zamieszczono w rozdziale **Wstęp** (ponad 1 strona). We wstępie Doktorantka nakreśliła w sposób wystarczający istotę, znaczenia i potrzebę badań o tej tematyce, wskazując na deficyt tego pierwiastka w większości gleb świata oraz udział procesów biologicznych, w tym aktywności enzymatycznej dehydrogenaz w procesach oksydoredukcyjnych w glebie. Procesy oksydoredukcyjne mają duże znaczenie w kształtowaniu rozpuszczalności, a tym samym mobilności i biodostępności selenu w układzie gleba – roślina.

Rozdział **Przegląd literatury**, liczący 16 stron został podzielony na 9 podrozdziałów I i II-go rzędu, w których Doktorantka zaprezentowała dotychczasowe osiągnięcia, dotyczące charakterystyki selenu, geochemicznego obiegu selenu w środowisku, biologicznych funkcji selenu, zawartości selenu w glebach, w tym czynników wpływających na zawartość selenu w glebie, zawartości selenu w glebach świata i w glebach polskich oraz charakterystykę dehydrogenaz i czynników wpływających na ich aktywność. Na końcu tego rozdziału zamieściła hipotezę badawczą i cel badań.

W podrozdziale dotyczącym charakterystyki selenu omówiła wyczerpująco jego właściwości chemiczne, podkreślając jego przynależność do tlenowców, jako półmetalu o właściwościach przejściowych, pierwiastka rzadkiego i rozproszonego w środowisku, który gromadzi się w złożach siarki i minerałach siarkowych, a w sprzyjających warunkach w obecności innych metali tworzy około 50 minerałów. Doktorantka zwróciła również uwagę na antropogeniczne źródła jego obecności w środowisku m.in. spalanie paliw, wytopianie i rafinacja miedzi, procesy przeróbki siarki i jej związków. Omówiła również jego odmiany alotropowe i izotopowe występujące w przyrodzie. Zwróciła przy tym uwagę na fakt jego występowania w środowisku naturalnym w związkach nieorganicznych na kilku stopniach utlenienia, stąd wielość związków tego pierwiastka m.in. selenowodór (-II), tlenki selenu (IV i VI), kwasy selenowe (IV i VI), seleniany i wodoroseleniany (IV). Na bazie literatury stwierdziła, że organiczne związki selenu są najbardziej dostępną formą tego pierwiastka dla roślin, zwierząt i ludzi. Zwracają również uwagę ważne informacje na temat występowania tego pierwiastka w organizmach w postaci selenoaminokwasów, zastępując siarkę w cysteinie i metioninie, tworzy selenocysteinę i selenometioninę, wchodzi więc w skład selenoprotein, w tym wielu selenoenzymów.

W podrozdziale geochemiczny obieg selenu w środowisku, Doktorantka stwierdziła, że inicjuje go proces wietrzenia skał wulkanicznych, a za jego pośrednictwem trafia do atmosfery,

jako tlenek selenu (IV), tlenochlorek i lotne pochodne alkilowe, skąd przedostaje się do wód podziemnych, jezior, móz, oceanów i gleby. Z gleby pobierany jest przez rośliny a następnie włączany do organizmów zwierząt i ludzi. Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt największej zawartości selenu w atmosferze nad terenami uprzemysłowionymi. Podkreśliła, duży udział w antropogenicznych źródłach selenu w atmosferze, emisji tego pierwiastka z przemysłu to m.in. spalanie węgla i ropy naftowej (40%), a także emisji z wysypisk śmieci i bagien. Doktorantka szczegółowo omówiła formy selenu w wodach naturalnych, w których zależnie od pH występuje na IV stopniu utlenienia i na VI stopniu utlenienia, przy czym seleniany (IV) w środowisku kwaśnym ulegają utlenieniu do selenu elementarnego, a w środowisku zasadowym i silnie utleniającym stabilizują się seleniany (VI).

Doktorantka rozpoznała zawartość selenu w glebach, stwierdzając jego występowanie w nich, na wszystkich podstawowych stopniach utlenienia (-II, 0, IV, VI). Jego zawartość w glebach kształtują: rodzaj skały macierzystej, intensywność procesów wymywania i wietrzenia, ilość materii organicznej, obecność innych pierwiastków, a także potencjał redoks, stężenie wolnego tlenu, pH i wilgotność. Mobilność i dostępność tego pierwiastka zależy od form jego występowania w glebach. Omówiła szczegółowo dostępność tego pierwiastka w glebach kwaśnych, obojętnych i zasadowych, stwierdzając największą dostępność w glebach zasadowych. Stwierdziła, że nieorganiczne formy selenu mogą podlegać biometylacji do lotnych form m.in. przy udziale mikroorganizmów, które w dużej mierze wpływają na zawartość selenu w glebie. Jednak pod wpływem zmian warunków środowiska, wszystkie formy selenu ulegają transformacji. Identyfikacja oraz określenie ilościowe różnych form selenu w środowisku, w tym mobilności i przyswajalności przez rośliny jest możliwe przez frakcjonowanie próbek gleb z zastosowaniem ekstrakcji różnych form selenu. Pobieranie tego pierwiastka przez rośliny zwiększa się wraz ze wzrostem pH i temperatury, a obniża się pod wpływem opadów atmosferycznych. Najczęściej pobierane przez rośliny formy selenu to rozpuszczalne seleniany (VI) i (IV), ale może być również pobierany w formie lotnej przez liście, a gromadzi się głównie w korzeniach jako selenoglutation lub selenometionina.

W podrozdziale: biologiczne funkcje selenu Doktorantka zwróciła uwagę na jego znaczenie jako ważnego mikroelementu dla funkcjonowania organizmów ludzkich i zwierzęcych, zwłaszcza, że jest składnikiem licznych selenobiałek, biorących udział w procesach metabolicznych ssaków. Wchodzi w skład peroksydazy glutationowej, która katalizuje redukcję różnych nadtlenczków oraz niektórych selenobiałek, które z kolei biorą udział w procesach dezaktywacji reaktywnych form tlenu. Bierze również udział w uaktywnieniu hormonu tarczycy, pozytywnie wpływa na układ immunologiczny organizmu, a także chroni DNA przed uszkodzeniem w wyniku działania substancji mutagennych i kancerogennych. Selenki neutralizują i usuwają ksenobiotyki i toksyczne substancje z organizmu np. metale ciężkie: Hg i Pb, działają grzybobójczo i zatrzymują infekcje wirusowe. Doktorantka podkreśliła także antykancerogenne działanie selenu, stwierdzając, że obniżona zawartość Se zwiększa podatność na nowotwory złośliwe, choroby sercowo-naczyniowe, reumatologiczne, zapalenie stawów, niewydolność nerek, stany depresyjne, lękowe i wiele innych.

W podrozdziale zawartość selenu w glebach, omówiła w sposób wyczerpujący czynniki wpływające na zawartość selenu w glebie, potwierdzając, że pierwiastek ten jest związany przez minerały ilaste, tlenki żelaza i substancję organiczną. Największe zawartości selenu występują w glebach wytworzonych z ilów trzeciorzędowych, a najmniejsze w glebach

piaszczystych. Jednak najzasobniejsze w selen są gleby wulkaniczne oraz gleby powstałe z czarnych łupków. Minerale ilaste typu 1:1 wiążą większe ilości selenu niż minerale typu 2:1, a selen związany z materią organiczną jest mniej dostępny dla roślin. Mechanizm sorpcji selenianów (IV) i (VI) różni się od siebie np. seleniany (IV) mają większe powinowactwo do tlenków i wodorotlenków Fe i Al niż seleniany (VI).

W podrozdziale zawartość selenu w glebach świata, Doktorantka podkreśliła, że zarówno niedobór, jak i nadmiar selenu może mieć negatywny wpływ na zdrowie zwierząt i ludzi np. niska zawartość Se w niektórych rejonach Chin była przyczyną występowania choroby endemicznej tj. przewlekłego zwyrodnienia mięśnia sercowego oraz obniżenia sprawności układu odpornościowego. Nadmiar selenu w diecie prowadzi do selenozy, inaczej choroby alkalicznej. Stężenie selenu w glebach uznane za nietoksyczne nie przekracza $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Selen, jako mikroelement silnie rozproszony w skorupie ziemskiej, kształtuje się w glebach świata od $0,05\text{-}1,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ przy czym podlega zróżnicowaniu w różnych typach i rodzajach gleb. Podkreśliła również występowanie w niektórych krajach „provincji selenowych” np. w USA, Kanadzie, Japonii, Indiach i Irlandii, tj. rejonów o bardzo dużej zasobności w ten pierwiastek. Z kolei tereny deficytowe występują np. w Chinach, Nowej Zelandii, krajach skandynawskich i innych. Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała gleby różnych krajów pod względem zawartości selenu.

W podrozdziale zawartość selenu w glebach polskich Doktorantka, stwierdziła w nich niski poziom tego mikroelementu, w związku z dużym udziałem gleb piaszczystych w większości wytworzonych z przemytych skał osadowych pochodzenia lodowcowego. Nie cały obszar gleb w Polsce został przebadany pod względem zawartości selenu. Najniższe zawartości tego pierwiastka stwierdzono w glebach powstałych z piasków luźnych i słabogliniastych, a najzasobniejsze w selen są gleby wytworzone z glin ciężkich i ilów. W ujęciu regionalnym najzasobniejsze gleby w selen występują w województwie zachodniopomorskim, śląskim i świętokrzyskim, a najuboższe są gleby województw: lubelskiego, warmińsko-mazurskiego, opolskiego i dolnośląskiego.

W podrozdziale charakterystyka dehydrogenaz (DHA), Doktorantka w wystarczającym stopniu scharakteryzowała dehydrogenazy, jako enzymy wewnątrzkomórkowe, zlokalizowane głównie w cytoplazmie, które są wysoce specyficzne. Aktywność tej grupy enzymów jest dobrym wskaźnikiem dla określenia intensywności i kierunków procesów biochemicznych, zachodzących w procesie glebotwórczym. Ich aktywność jest także wskaźnikiem funkcji oddechowej, związanej z intensywnością metabolizmu oddechowego mikroorganizmów glebowych.

W podrozdziale czynniki wpływające na aktywność dehydrogenaz Doktorantka stwierdziła, że na ich aktywność mogą mieć wpływ inhibitory, jak i katalizatory. Aktywność tych enzymów pobudzają niskocząsteczkowe związki, jony metali Ca, Mg, Mn, a rzadziej Co, Cu, Ni oraz czynniki środowiska (wilgotność, temperatura, pH), zawartość Corg., sezonowość i głębokość profilu glebowego. Szczególne znaczenie w kształtowaniu aktywności dehydrogenaz wykazuje materia organiczna gleb. Z kolei hamująco na aktywność dehydrogenaz w glebie wpływają m.in. pierwiastki: As, Hg, Cd, Cr i Pb.

Hipoteza badawcza zakłada, iż gleby uprawne występujące w rejonie Kujaw są ubogie w selen, co powoduje niedostateczne zaopatrzenie roślin w ten pierwiastek. Przyjmuje się, że zawartość wymiennych i rozpuszczalnych w wodzie form selenu rozpatrywana na tle

parametrów określających ich ruchliwość tj. odczynu gleby, zawartości frakcji ilowej i próchnicy glebowej, może być wskaźnikiem nadmiaru lub deficytu tego pierwiastka w środowisku glebowym. Hipoteza zakłada także wpływ aktywności enzymów oksydoredukcyjnych na przemiany selenu w glebie i jego mobilność w roztworze glebowym w trakcie okresu wegetacyjnego. Szczególne znaczenie w kształtowaniu ich aktywności wykazuje materia organiczna gleb. Hamująco na aktywność enzymów dehydrogenaz w glebie wpływają m.in. As, Cd, Pb, Cr, Hg.

Celem badań było określenie dynamiki zmian zawartości selenu w wybranych glebach uprawnych oraz określenie mobilności tego pierwiastka w środowisku glebowym.

Cele szczegółowe to:

- określenie zmian sezonowych całkowitej zawartości selenu w czarnych ziemiach użytkowanych rolniczo, czarnych ziemiach pod łąkami oraz glebach płowych,
- określenie rozmieszczenia selenu w profilach badanych gleb,
- ocena mobilności selenu w środowisku za pomocą analizy specjacyjnej,
- prześledzenie sezonowych zmian aktywności dehydrogenazowej tych gleb i określenie jej wpływu na mobilność i dostępność selenu dla roślin,
- określenie związków między analizowanymi parametrami w badanych glebach.

W rozdziale **Materiał i metody**, liczącym 10 stron, Doktorantka wyróżniła cztery podrozdziały: charakterystyka materiału glebowego, analiza chemiczna materiału glebowego i analiza statystyczna. W podrozdziale charakterystyka materiału glebowego omówiła materiał glebowy, który pobrała w miejscowości Gniewkówiec (woj. kujawsko-pomorskie, gmina Złotniki kujawskie) w układzie całkowicie losowym. Badaniami objęto 16 profili glebowych zlokalizowanych za pomocą GPS, które zgodnie z „Systematyką Gleb Polski” [2011] zaliczono do następujących jednostek hierarchicznych: rząd – gleby czarnoziemne, typ – czarne ziemie (9 profili: w tym 6 profili czarnych ziem użytkowanych rolniczo i 3 profile czarnych ziem pod łąkami); rząd – gleby płowoziemne, typ – gleby płowe (7 profili).

Zgodnie z klasyfikacją PTG badane gleby czarnoziemne zaliczyła do gatunków: glina piaszczysta drobnoziarnista oraz glina lekka, a gleby płowoziemne, należały do gatunków: glina piaszczysta drobnoziarnista, piasek gliniasty drobnoziarnisty oraz piasek słabogliniasty drobnoziarnisty. W formie tabelarycznej przedstawiła: lokalizację GPS badanych gleb, skład granulometryczny, nawożenie (NPKS) zastosowane na badanych glebach czarnych ziemiach i płowych oraz uprawiane rośliny, które były zróżnicowane w latach badań (2012, 2013). Przedstawiła także zabiegi agrotechniczne (rodzaj zabiegu, termin wykonania zabiegu i głębokość) oraz uprawiane rośliny na czarnych ziemiach i glebach płowych.

W badanych latach na czarnych ziemiach uprawiono następujące rośliny: jęczmień jary, żyto jare, brokuły, cukinia (2012) oraz pszenicę ozimą, jęczmień jary, kukurydzę, cebulę, cukinię, marchew (2013). Na glebach płowych uprawiano: jęczmień jary, żyto jare, kukurydza, rzepak ozimy, mieszanka zbożowa (jęczmień + owies) (2012) oraz pszenicę ozimą, pszenżyto ozime, jęczmień jary, kukurydzę, buraki cukrowe (2013). Wykonywane zabiegi agrotechniczne pod uprawę każdej rośliny zostały szczegółowo wyszczególnione wraz z ich głębokością i terminem wykonania.

W podrozdziale **Warunki klimatyczne** przedstawiła temperaturę oraz ilość i rozkład opadów, na podstawie danych udostępnionych przez Katedrę Melioracji i Agrometeorologii Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii. Badania te zostały przeprowadzone w miejscowościach

Mochełek pod Bydgoszczą na obszarze mało zurbanizowanym i uprzemysłowionym. Stwierdziła, że zarówno w rok 2012, jak i 2013 charakteryzował się bardzo mokrym latem. Znaczne przekroczenia średnich z okresu normalnego wystąpiły w miesiącach czerwiec i lipiec. Ponadto rok 2013 okazał się rokiem o zwiększonej liczbie opadów w stosunku to średniej z okresu normalnego.

W podrozdziale **Analiza chemiczna materiału glebowego**, Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała procedury analityczne i zakres wykonywanych analiz glebowych. Materiał glebowy pobrano w latach 2012 i 2013 z trzech głębokości: 0-30 cm, 30-60 cm i 60-100 cm, pięciokrotnie w ciągu roku w miesiącach: marzec, maj, lipiec, wrzesień i listopad z tych samych stałych punktów badawczych.

W analizowanych próbkach gleb przeprowadzono następujące oznaczenia:

- skład granulometryczny metodą areometryczną Cassagrande'a w modyfikacji Prószyńskiego, zawartość części szkieletowych oznaczono metodą sitową,
- pH w H₂O i w 1 mol·dm⁻³KCL – potencjometrycznie, wg normy PN-ISO 10390,
- zawartość węgla w związkach organicznych (C_{org}) i azotu ogółem (Nt) przy użyciu analizatora Vario Max CN, firmy Elementar,
- całkowitą zawartość selenu w glebie oznaczono metodą spektrofotometryczną Watkinsona (1966), przy czym próbki glebowe zmineralizowano na mokro w mieszaninie stężonego kwasu HNO₃ i 30% H₂O₂ w zamkniętym układzie mikrofalowym firmy Millestone. Do oznaczenia selenu ogólnego wykorzystano fluorescencję za pomocą spektrofotometru F-2000 firmy Hitachi, przy długości fali wzbudzenia 376 nm i fali emisji 520 nm.

Dokonano także oceny dokładności i powtarzalności zastosowanej techniki z wykorzystaniem detekcji selenu poprzez oznaczenie błędu metody i próby odzysku. Selen ogółem został oznaczony w certyfikowanym materiale przygotowanym przez Resource Technology Corporation (RTC),

- zawartość selenu w poszczególnych frakcjach wykonano z wykorzystaniem 5-cio stopniowej analizy specjacyjnej, zgodnie z procedurą Chao i Sanzolone (1989) w modyfikacji Wang i Chen (2003), która opiera się na założeniach Tessiera i in. (1979). Analiza specjacyjna została przeprowadzona w następujących po sobie etapach:
 - I. ekstrakcja niespecyficznie adsorbowanych selenianów (VI), z wytrząsaniem materiału glebowego z 0,25 M KCL. W ekstrakcji tej frakcji wykorzystuje się zjawisko wymiany jonowej: adsorpcji i desorpcji. Selen tej frakcji jest łatwo pobierany i przyswajany przez rośliny ;
 - II. ekstrakcja frakcji wymiennej (specyficzne adsorbowane seleniany (IV)) z wykorzystaniem efektywnego ekstrahentu – 0,1 M KH₂PO₄, w wyniku czego powstaje rozpuszczalny kompleks z metalem. Jest to forma selenu również łatwo pobierana przez rośliny, choć mniej mobilna, jak seleniany (VI);
 - III. ekstrakcja frakcji selenu związanego z amorficznymi tlenkami żelaza, manganu i glinu, a także węglanami z zastosowaniem 4 M HCl, który wymywa selen związany z Fe, Mn, Al i węglanami. Dodatkowo ma on zdolność do hydrolizowania glebowej materii organicznej. Selen wyekstrahowany w tej frakcji może zostać potencjalnie dostępny po uwolnieniu na drodze chemicznej lub przez mikroorganizmy;

- IV. ekstrakcja selenu skompleksowanego z materią organiczną oraz chemicznie sorbowane (wtórne węglany, fosforany, siarczany) z wykorzystaniem mieszaniny silnie utleniającej tj. stałego chloranu potasu i stężonego HCl. Mieszanina ta jest silnie utleniająca i powoduje rozkład substancji organicznej z uwolnieniem selenu z nią związanego. Selen tej frakcji jest niedostępny dla roślin.
- V. ekstrakcja frakcji rezydualnej selenu, z użyciem mieszaniny kwasów HF, HClO₄, HNO₃, całkowicie roztwarzających fazę stałą gleby. Frakcja rezydualna obejmuje formy selenu związane z minerałami. Selen tej frakcji ma marginalne znaczenie dla środowiska i jest zupełnie niedostępny dla roślin.

W zastosowanej analizie specjacyjnej zgodnie z modyfikacją Wang i Chen (2003) każdy roztwór po zakończeniu ekstrakcji zakwaszono kwasem HCl tak, aby otrzymać pH=1,7-2. Powstałe seleniany (IV) związane zostały z 2,3-diamminonaftalenem. Następnie zmierzono fluorescencję powstałego kompleksu za pomocą spektrofluorymetru.

- aktywność dehydrogenaz (DHA) oznaczono metodą Thalmana (1968), a oznaczenie wykonano za pomocą spektrofotometru Marcel PRO, przy długości fali 546 nm. Wyniki podano w mg TPF·g⁻¹s.m.·24h⁻¹.

W podrozdziale **Analiza statystyczna**, Doktorantka przedstawiła obliczenia statystyczne przy użyciu programu Statistica 10 oraz arkusza MS Office Excel. Do oceny rozmieszczenia badanych parametrów w warstwach gleby obliczono współczynniki rozmieszczenia (ID). Do oceny dynamiki zawartości badanych parametrów w czasie (od marca do listopada), wykorzystano współczynniki zmiany w czasie (TI), (Lemanowicz i Krzyżaniak 2015).

Do oceny wpływu nawożenia mineralnego i organicznego, a także wpływu roślin rosnących na badanych glebach zastosowano porównanie za pomocą testu t-Studenta dla prób niezależnych. W celu określenia stopnia współzależności pomiędzy badanymi cechami zastosowano analizę korelacji prostej Pearsona przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Stwierdzam, że analiza chemiczna materiału glebowego wraz z oznaczeniem aktywności enzymów dehydrogenaz została wykonana z zastosowaniem właściwych procedur analitycznych, obecnie stosowanych w badaniach gleboznawczych z użyciem nowoczesnego sprzętu, co umożliwiło Doktorantce wykonanie wysoce specjalistycznych i analitycznie trudnych oznaczeń selenu ogółem i jego frakcji chemicznych.

Obliczenia statystyczne wykonano przy zastosowaniu nowoczesnych metod m.in. programu Statistica 10 i arkusza MS Office Excel.

Doktorantka dobrze opanowała metodologię prowadzenia badań terenowych, laboratoryjnych, w tym szeroki zakres prac analitycznych, specjalistyczną i nowoczesną aparaturę badawczą, a także nowoczesne metody analizy statystycznej. Rozdział ten jest opracowany przejrzysto z dużą znajomością warsztatu badawczego.

W rozdziale **Wyniki badań**, liczącym 42 strony, Doktorantka przedstawiła wyniki badań i wyczerpująco je omówiła. Jest to obszerny rozdział podzielony na 11 podrozdziałów I i II-go rzędu, w którym zestawiała wyniki badań, grupując je w następującej kolejności; podstawowa charakterystyka gleby, w tym: pH badanych gleb, zawartość węgla związków organicznych (TOC), zawartość azotu całkowitego (NT), stosunki węgla związków organicznych do całkowitego azotu; zawartość selenu ogółem, w tym: zawartość poszczególnych frakcji selenu w glebie, procentowy udział poszczególnych frakcji selenu w całkowitej zawartości tego pierwiastka; aktywność dehydrogenaz (DHA); analiza statystyczna,

w tym: zależności między zawartością selenu i jego frakcji w glebie, aktywnością dehydrogenaz oraz podstawowymi właściwościami badanych gleb, wpływ zastosowanego nawożenia, uprawianych roślin na zawartość selenu jego frakcji oraz aktywnością enzymatyczną badanych gleb.

Autorka dokonała podstawowej charakterystyki gleb, w oparciu o wartości pH mierzone w wodzie i 1 M KCL, traktując je odpowiednio: jako kwasowość czynną i wymienną. Stwierdziła szeroki zakres ich wartości i zróżnicowanie w obrębie głębokości z ukierunkowaniem na najwyższe wartości tych parametrów w glebach na głębokości 60-100 cm. Wartości pH czarnych ziem i gleb płowych użytkowanych rolniczo, były zbliżone. Zawartość węgla związków organicznych przyjmowała w czarnych ziemiach zróżnicowane wartości w zależności od sposobu użytkowania; znacznie wyższe wartości wystąpiły w glebach pod łąkami niż uprawnych, obniżenie się TOC wraz z głębokością gleby, tak w glebach uprawnych, a szczególnie czarnych ziemiach pod łąkami. Zawartość węgla organicznego w uprawnych glebach płowych miała wartości zbliżone do czarnych ziem uprawnych. Współczynniki rozmieszczenia Corg. (ID), wskazują na wzbogacenie, szczególnie warstw powierzchniowych, ale i podpowierzchniowych w ten pierwiastek w porównaniu do najgłębszych (60-100 cm). Zmiany Corg. w czasie (TI) wykazały jego obniżenie w sezonie wegetacyjnym w glebach pod łąkami.

Azot całkowity (Nt) w zawartości i rozmieszczeniu korespondował z ilością Corg. w czarnych ziemiach pod łąkami i uprawnych oraz w glebach płowych, co potwierdziło znaną zależność między tymi pierwiastkami. Stosunek TOC / Nt był zbliżony w glebach uprawnych (9:1) a szerszy czarnych ziemiach pod łąkami (13:1).

Doktorantka wykazała, że czarne ziemie pod łąkami charakteryzowały znacznie wyższymi zawartościami selenu całkowitego niż gleby uprawne. Selen całkowity w terminach badań przedstawiał się także ilościowo najkorzystniej w czarnych ziemiach pod łąkami. W uprawnych czarnych ziemiach i glebach płowych całkowita zawartość selenu w profilach glebowych kształtowała się na zbliżonym poziomie, a w czarnych ziemiach pod łąkami wyraźnie obniżała się w głąb profilu. W okresie wegetacji ogólna zawartość selenu obniżała się, a zwiększała się jesienią, przy pewnych odchyleniach w latach badań. Obliczone współczynniki zmiany (TI) potwierdzają sezonowe zmiany całkowitej zawartości selenu w okresie badań.

W podrozdziale dotyczącym zawartości poszczególnych frakcji selenu w glebie, Doktorantka szczegółowo przedstawiła i omówiła badane pięć frakcji Se w glebach uprawnych i pod łąkami. W przeprowadzonych badaniach wykazała, że frakcje fitoprzyswajalne, szczególnie w czarnych ziemiach użytkowych rolniczo, podlegały dużym wahaniom, a ich kumulacja wystąpiła w najgłębszej warstwie (60-100 cm). Współczynniki rozmieszczenia (ID) dla selenianów (VI) w czarnych ziemiach użytkowanych rolniczo wskazują również, że selen tej frakcji (FI) był na ogół skumulowany w warstwie najgłębszej (60 -100 cm) i najczęściej podobnie seleniany (IV), (FII). Niemal identyczna sytuacja występowała w glebach płowych uprawnych. Selen związany z amorficznymi tlenkami (FIII), występował na ogół w warstwie powierzchniowej czarnych ziem uprawnych. Z kolei w czarnych ziemiach pod łąkami selen frakcji: I, II, III, IV i przeważnie frakcji V, był zgromadzony w warstwie powierzchniowej i obniżał się wraz z głębokością gleby. Pewne odchylenia od tych prawidłowości, Doktorantka wykazała w niektórych latach badań. Szczegółowo scharakteryzowała dynamikę badanych

frakcji selenu w poszczególnych głębokościach gleb w wyznaczonych terminach badań sezonów wegetacyjnych. Wykazała najczęściej obniżenie się frakcji fitoprzyswajalnych od maja do lipca, a jesienią ich zwiększenie np. w glebach pługowych w warstwach 0-30 cm i 60-100 cm. Najniższą zawartość selenu frakcji fitoprzyswajalnych we wszystkich badanych glebach stwierdziła w pełni sezonu wegetacyjnego, a jesienią ich ilość zwiększała się. W badanych glebach dominowała frakcja selenu skompleksowanego z materią organiczną, a niekiedy z tlenkami metali. Udział frakcji skompleksowanej z materią organiczną był zbliżony w czarnych ziemiach a mniejszy był w glebach pługowych. Doktorantka wykazała w badanych czarnych ziemiach użytkowanych rolniczo i pod łąkami oraz w glebach pługowych najwyższą aktywność dehydrogenaz w powierzchniowej warstwie gleby (0-30 cm) we wszystkich terminach badanych sezonów wegetacyjnych.

Współczynniki rozmieszczenia (ID) wskazują, że aktywność enzymatyczna dehydrogenaz obniżyła się w warstwie (30-60 cm) 2-3-krotnie w czarnych ziemiach użytkowanych rolniczo i pod łąkami, a 5-krotnie w glebach pługowych. W sezonie wegetacyjnym stwierdziła przeważnie obniżenie aktywności dehydrogenaz w czarnych ziemiach. Brak jednoznacznych zmian aktywności tych enzymów w latach badań wystąpiły w glebach pługowych, szczególnie w warstwie głębszej (30-60 cm).

Wyliczone wskaźniki zmian w czasie (TI) wskazują na sezonowe zmiany aktywności dehydrogenazowej w badanych glebach.

W podrozdziale analiza statystyczna, Doktorantka zaprezentowała i skomentowała obliczone współczynniki korelacji pomiędzy selenem ogólnym i jego frakcjami chemicznymi a właściwościami gleb (TOC, Nt, pH w H₂O i KCL oraz DHA) w latach badań. Szczególnie w drugim roku badań stwierdzono dość silne zależności pomiędzy selenem ogólnym i jego frakcjami a zawartością Corg.; selenem ogólnym a zawartością azotu ogółem; frakcjami selenu (FII, FIII) a aktywnością dehydrogenaz w warstwie powierzchniowej czarnych ziem użytkowanych rolniczo. Obliczono również współczynniki korelacji pomiędzy tymi cechami dla pozostałych warstw badanych gleb.

Doktorantka badała wpływ nawożenia organicznego i naturalnego zastosowanego w glebach pługowych na zawartość selenu ogółem i jego frakcji oraz aktywność dehydrogenaz. Wykazała, że w glebach na których stosowano nawożenie organiczne i naturalne były wyższe wartości tych cech, szczególnie w drugim roku badań w warstwach głębszych i najgłębszych. W obu latach badań średnie zawartości selenu ogółem i selenianów (VI) w warstwie powierzchniowej wykazują niższe wartości w glebach nawożonych organicznie. Aplikacja nawozów organicznych do gleby wpłynęła na wyższe wartości tych parametrów w glebach na głębokości 30-60 cm i 60-100 cm. Zawartość selenianów (IV) na ogół przyjmowała wyższe wartości w glebach nienawożonych. Wykazano, że w warstwie powierzchniowej gleby pługowej aktywność dehydrogenaz była wyższa po zastosowaniu nawożenia niż przy jego pominięciu. Nawożenie mineralne azotem w dawce powyżej 120 kg N·h⁻¹ wpłynęło korzystnie (w pierwszym roku badań), na zawartość selenu ogółem w badanych głębokościach czarnych ziem, za wyjątkiem głębokości 0-30 cm. Nawożenia azotem nie wpływał jednoznacznie na zawartość frakcji chemicznych selenu. Aktywność enzymatyczna wykazywała tendencję wzrostu po zastosowaniu nawożenia azotem poniżej 120 kg N·h⁻¹. Całkowita zawartość selenu w czarnych ziemiach jak użytkowanych rolniczo, na których uprawiano zboża, była wyższa niż w glebach pod warzywami. Zawartość selenu związanego substancją organiczną była istotnie

wyższa w czarnych ziemiach użytkowanych rolniczo pod uprawą roślin zbożowych. W badanych latach aktywność DHA była wyższa w poziomie powierzchniowym czarnych ziem użytkowanych rolniczo pod uprawą warzyw. Z kolei w głębszych warstwach gleby pod uprawą zbóż, aktywność DHA była wyższa.

Rozdział ten jest bardzo bogaty w interesujące wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę. Wyniki badań są omówione i przedstawione przejrzysto, przy tym bardzo dobrze udokumentowane w postaci tabel szczegółowych i zbiorczych oraz rysunków. Wyniki badań są dobrze opracowane statystycznie.

W rozdziale **Dyskusja wyników**, liczącym 10 stron, Doktorantka skonfrontowała wyniki badań własnych z literaturą dotyczącą zagadnień selenu, jego form i aktywnością dehydrogenaz w glebach. Stwierdziła, że na tle innych krajów europejskich zawartość selenu w glebach polskich jest niska i wynosi średnio $0,27 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. W Polsce w glebach bielcowych występują najniższe zawartości selenu, a najwyższe w glebach organicznych. Doktorantka w oparciu o literaturę porównała gleby polskie pod względem zawartości selenu z innymi glebami Europy i świata. Szczegółowo przeanalizowała wyniki badań własnych, w aspekcie różnych czynników środowiskowych, wpływających na zawartość i rozmieszczenie w glebach selenu ogólnego i jego form. Przytoczyła ważne treści, że w glebach bogatych w selen przy niewielkich opadach (500 mm rocznie), pierwiastek ten może mieć toksyczny wpływ na rośliny i zwierzęta. Równocześnie przedyskutowała szczegółowo przyswajalność selenu przez rośliny przy wysokim pH na obszarach z niewielkimi opadami atmosferycznymi, stwierdzając wówczas najlepszą przyswajalność. Na glebach kwaśnych przy dużych opadach atmosferycznych ulega znacznemu obniżeniu przyswajalność selenu przez rośliny. Doktorantka stwierdziła niską sumę opadów atmosferycznych w rejonie Kujaw, co może korzystnie wpływać na gromadzenie tego pierwiastka w roślinach.

Doktorantka bardzo wnikliwie przedyskutowała swoje wyniki badań w oparciu o literaturę krajową i światową, wykorzystując do tego celu ok. 90 pozycji bibliograficznych bardzo dobrze dobranych do realizowanej problematyki badawczej.

Zakończeniem części merytorycznej są **Wnioski**, będące odpowiedzią na postawioną wcześniej hipotezę badawczą i założone cele badań. Doktorantka sformułowała 10 wniosków, wynikających z przeprowadzonej analizy, które są udokumentowane wynikami badań. Wnioski od 1-3 odnoszą się do zawartości selenu ogółem w glebach użytkowanych rolniczo i pod łąkami z uwzględnieniem zmian sezonowych. Wnioski od 4-6 dotyczą wpływu nawożenia organicznego, naturalnego i mineralnego – azotem oraz uprawianych roślin na zawartość selenu ogółem. Wnioski 7 i 8 przedstawiają dynamikę fitoprzyswajalnych form selenu w glebach i w sezonach wegetacyjnych, ze wskazaniem na najniższą zawartość tych frakcji selenu w pełni sezonu wegetacyjnego, a ich zwiększenia jesienią. Odnoszą się także do skompleksowanej frakcji Se z materią organiczną, której udział w ogólnej zawartości selenu był szczególnie wysoki w czarnych ziemiach. Wniosek 9 dotyczy występujących korelacji między zawartością węgla organicznego a całkowitą zawartością selenu i poszczególnych frakcji w poziomie powierzchniowym gleby. Wniosek 10 podsumowuje badania aktywności enzymatycznej dehydrogenaz, ze wskazaniem na zmiany sezonowe, najwyższą aktywność w poziomie powierzchniowym i korelacje między aktywnością tych enzymów a zawartością selenianów (IV) i selenu związanego a amorficznymi tlenkami metali w tym poziomie.

Wniosek końcowy

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską Pani mgr inż. Marleny Grabowskiej-Wrzesińskiej oceniam bardzo pozytywnie. Stanowi ona oryginalne dzieło spełniające wszystkie wymogi dobrej rozprawy doktorskiej. Pani mgr inż. M. Grabowska-Wrzesińska włożyła bardzo dużo pracy w przygotowanie eksperymentu badań terenowych oraz wykonanych w warunkach laboratoryjnych bardzo dużej ilości, trudnych metodycznie analiz i zgromadzeniu dużej ilości literatury, w tym z przewagą anglojęzycznej, a także w opracowanie wyników badań. Uzyskała bardzo interesujące rezultaty z dobrze zaplanowanych i poprawnie przeprowadzonych badań, które skonfrontowała z literaturą polską i światową. Doktorantka prawidłowo dobrała i zastosowała metody badań laboratoryjnych, stosując wyspecjalizowane i wysoce zaangażowane metody pomiaru oraz nowoczesne metody statystyczne.

Uzyskane rezultaty badań, związane z dynamiką różnych form selenu w czarnych ziemiach uprawnych, czarnych ziemiach pod łąkami oraz w glebach płowych w kontekście mobilności i dostępności selenu dla roślin w powiązaniu m.in. z aktywnością enzymatyczną dehydrogenaz, stanowią dużą wartość, którą Doktorantka wnosi do nauki polskiej i europejskiej.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Marleny Grabowskiej-Wrzesińskiej spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2013 roku „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. Nr 65 z 2003 r. poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz zawiera się w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska. Dlatego stawiam wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, o dopuszczenie Pani mgr inż. Marleny Grabowskiej-Wrzesińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę ważność i aktualność problematyki w realizowanych badaniach, wysoki poziom merytoryczny oraz ich naukowy i aplikacyjny charakter, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 01.09.2017 r.

