

Warszawa, 07 stycznia 2016 r.

Dr hab. Joanna Mirosław-Grabowska

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pana mgr Eugeniusza Pronina

pt. „Skład stabilnych izotopów $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{18}\text{O}$ w inkrustacjach węglanowych ramienic (*Characeae*)
jako wskaźnik warunków środowiska jeziornego”

Prowadzone od wielu lat badania paleo- i limnologiczne mają na celu m.in. rekonstrukcję warunków środowiska jeziornego występujących w przeszłości i obserwowanych współcześnie. Szeroko zakrojone studia wyrażają się również w udoskonalaniu stosowanych metod badawczych, w tym fizyko-chemicznych, izotopowych i biologicznych.

Przekazana do recenzji praca doktorska Pana mgr Eugeniusza Pronina wpisuje się w zakres aktualnych prowadzonych badań limnologicznych z zastosowaniem metod izotopowych. Podjęcie przez Doktoranta tematu, bazującego na wynikach analizy izotopów trwałych tlenu i węgla m.in. węglanowych inkrustacji ramienic, recenzent uważa za celowe, szczególnie pod względem metodyki badań izotopowych, możliwości stosowania tych analiz, ograniczeń metody, a także weryfikacji otrzymanych wyników. Jest to szczególnie ważne w przypadku prowadzenia badań multidyscyplinarnych, np. geochemicznych i biologicznych, których wyniki są podstawą dokonywanych rekonstrukcji ekologicznych.

1. Koncepcja i układ pracy

Rozprawa doktorska Pana mgr Eugeniusza Pronina pt. „Skład stabilnych izotopów $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{18}\text{O}$ w inkrustacjach węglanowych ramienic (*Characeae*) jako wskaźnik warunków środowiska jeziornego” została ukończona w 2015 roku w Zakładzie Hydrobiologii Instytutu Biologii Środowiska, na Wydziale Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Mariusza Pełechatego, prof. UAM i dr Kariny Apolinarskiej. Praca doktorska została zrealizowana w ramach Środowiskowych Studiów Doktoranckich w zakresie Nauk o Środowisku Przyrodniczym Wydz. Biologii UAM.

Podstawę przygotowania recenzji stanowiła uchwała Rady Wydziału Biologii UAM z dn. 24 kwietnia 2015 r.

Rozprawa doktorska liczy łącznie 124 strony tekstu złożonego z 9 rozdziałów z licznymi podrozdziałami. W spisie literatury wymieniono 124 pozycje. W tekście zamieszczono 30 rycin i 13 tabel.

Układ rozprawy jest przejrzysty. W **rozdziale 1 – Wstęp**, po krótkim Wprowadzeniu i omówieniu stanu badań stabilnych izotopów tlenu i węgla w inkrustacjach ramienic, określono **Cele badawcze**, którymi są: 1) „sprawdzenie zależności pomiędzy składem stabilnych izotopów węgla i tlenu w węglanach ramienicowych, wytworzonych przez dwa [...] gatunki ramienic [...] a składem izotopowym wody z bezpośredniego otoczenia ramienic oraz wody pelagicznej”; 2) „sprawdzenie zależności pomiędzy składem stabilnych izotopów węgla i tlenu a cechami fizyczno-chemicznymi wody oraz strukturą zbiorowisk ramienic”, 3) „sprawdzenie istnienia zróżnicowania międzygatunkowego pomiędzy składem izotopowym inkrustacji i materii organicznej badanych gatunków ramienic” oraz 4) „sprawdzenie istnienia zróżnicowania wewnątrzgatunkowego pomiędzy składem izotopowym inkrustacji oraz materii organicznej w rozpatrywanych warunkach środowiska jeziornego”.

Rozdział 2 zawiera opis **Terenu badań** z uwzględnieniem: Genezy, charakterystyki morfologicznej i położenia badanych jezior.

W **rozdziale 3** zatytułowanym **Materiały i metody** opisano: - Prace terenowe, a zwłaszcza sposób pobrania materiału badawczego, obejmującego próby po 10 plech z dwóch gatunków ramienic oraz próby wody z najbliższego otoczenia ramienic (po trzy stanowiska, łącznie w 7 jeziorach) oraz próby wody pelagicznej z badanych jezior: Jasne, Niesłysz, Żłoty Potok, Pierwsze, Męcisko Duże, Malcz Południowy i Karskie Wielkie; - Prace laboratoryjne, a w nich: 1) identyfikację pobranych makrofitów; 2) analizę składu izotopów trwałych tlenu i węgla w różnym materiale badawczym: w węglanowych inkrustacjach, w wodzie, w materii organicznej; 3) analizy fizyczno-chemiczne wody oraz 4) opracowanie wyników, skoncentrowane głównie na statystycznym opracowaniu danych.

W **rozdziale 4** na 54 stronach przedstawiono bardzo obszernie **Wyniki** wszystkich przeprowadzonych badań tzn. analiz fizyko-chemicznych wody; składu i struktury zbiorowisk ramienic; składu izotopów trwałych węgla w rozpuszczonym węglu nieorganicznym w wodzie, w inkrustacjach węglanowych ramienic, w materii organicznej; składu izotopów trwałych tlenu w wodzie i w inkrustacjach węglanowych ramienic, a także zależności pomiędzy otrzymanymi wynikami. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej oraz zaprezentowane w postaci wykresów i tabel.

W recenzowanym egzemplarzu pracy nie występuje **rozdział 5** – błąd w numeracji rozdziałów.

Następny rozdział to **rozdział 6**, który zawiera **Dyskusję**.

Rozdział 7 stanowi **Podsumowanie i Wnioski** z przeprowadzonych badań węglanowych inkrustacji ramienic z siedmiu jezior Pojezierza Lubuskiego.

Ostatnie rozdziały to **Streszczenie** w języku polskim (**rozdział 8**) i angielskim (**Summary – rozdział 9**) oraz **Bibliografia** (**rozdział 10**).

2. Ocena pracy

Podjęta przez Doktoranta tematyka badawcza jest bardzo interesująca i dobrze wpisuje się w aktualne trendy badań z zakresu ekologii i limnologii. Ramienice wpływają zarówno na abiotyczne i biotyczne elementy ekosystemów wodnym, co jest podstawą badań ekologicznych i rekonstrukcji paleośrodowiskowych. Ponadto zdolność ramienic do wytwarzania inkrustacji węglanowych, a tym samym udział ramienic w akumulacji węglanowych osadów jeziornych, może być również z powodzeniem wykorzystane w badaniach izotopowych i mineralogicznych. Recenzent wysoko ocenia sformułowanie tematu badawczego, jaki postawione cele badawcze, ponieważ dla wiarygodnego wykorzystania w rekonstrukcjach środowiska zapisu $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{18}\text{O}$ w węglanach pochodzenia ramienicowego, trzeba poznać zależności pomiędzy składem izotopów trwałych węgla i tlenu współczesnych ramienic, a składem wody i materii organicznej.

Podstawową metodą badawczą zastosowaną przez Pana mgr Eugeniusza Pronina do realizacji celów pracy doktorskiej, była analiza izotopów trwałych tlenu i węgla inkrustacji węglanowych ramienic, wody z otoczenia inkrustowanych ramienic, wody pelagicznej oraz materii organicznej plech ramienic pozostającej po rozpuszczeniu węglanów. W ramach badań terenowych w 2012 r. Doktorant pobrał próbki wody oraz plech ramienicowych z siedmiu jezior Pojezierza Lubuskiego. Okazy ramienic zostały oznaczone zgodnie z odpowiednimi kluczami, a następnie przygotowane do analiz izotopowych, zgodnie z obowiązującą standardową procedurą. Analizy izotopowe i fizyczno-chemiczne wykonane zostały w jednostkach zewnętrznych w stosunku do Zakładu macierzystego Doktoranta – w tym miejscu recenzentowi brakuje informacji o wkładzie pracy Doktoranta w ten proces analityczny.

Uzyskane wyniki badań laboratoryjnych zostały poddane analizie statystycznej. Doktorant zastosował szereg metod statystycznych m.in. analizę korelacji Pearsona, analizę głównych składowych (PCA), analizę redundancji (RDA), test Monte Carlo i tu pojawia się wątpliwość, czy Doktorant dysponował wystarczającą ilością danych pomiarowych, tzn. prób, stanowisk, pomiarów? Aby otrzymać rzetelne oceny kanonicznych ładunków czynnikowych, zaleca się mieć co najmniej 20 razy więcej przypadków niż zmiennych w analizie, aby interpretować tylko najbardziej istotne pierwiastki kanoniczne. Recenzentowi brakuje w materiale badawczym kilkunastu powtórzeń analiz i/lub pomiarów z tych samych stanowisk badawczych, zwłaszcza w różnych miesiącach oraz w różnych warunkach hydrologicznych i klimatycznych (różnice w temperaturze i wielkości opadów). W przypadku jednego cyklu poboru próbek do pomiarów zachodzi duże prawdopodobieństwo przypadkowości danych. W prezentowanych licznych wykresach analizy głównych składowych brakowało recenzentowi

wyraźnego zdefiniowania, które dane są zmiennymi, a które wartościami własnymi opisującymi zmienność pierwotnych danych, czyli jak są zdefiniowane główne składowe? Ponadto, w jaki sposób analizy statystyczne uwzględniły skład i strukturę gatunkową zbiorowisk ramienic (jakie były zmienne: skład gatunkowy, liczba wystąpień, pokrycie?); jak Doktorant definiuje te główne składowe?

Recenzent ma duże wątpliwości nt. słuszności wyliczenia temperatury na podstawie wyników $\delta^{18}\text{O}$ z węglanów pochodzenia ramienicowego i wody. Oczywiście zastosowane przez Doktoranta wzory są publikowane w uznanych pracach m.in. Leng i in. 2005 i Leng & Marshall 2004, ale trzeba pamiętać, że początkowo wzory te były opracowane dla fosylnych muszli kalcytowych otwornic, pozostających w równowadze izotopowej z wodą oceaniczną. Ponadto, część badanych jezior tworzy system zamknięty, a część – otwarty, co wpływa na cyrkulację wody. Dalsze pytania to: jaki jest czas retencji w badanych jeziorach i jak został on uwzględniony w interpretacji? Jak w okresie pobierania prób wyglądała wymiana wód (dopływy, falowanie, opady)? I na koniec – jaka temperatura została tak naprawdę obliczona? – na pewno nie była to temperatura, którą zmierzono w czasie poboru próbek, ponieważ inkrustacje węglanowe już wtedy istniały, bo były wcześniej wytrącone. Kiedy analizowane inkrustacje powstawały i jakich warunkach? Na str. 99 Doktorant stwierdza „...Jednakże, z uwagi na to, że nie prowadzono badań dotyczących całego okresu, w którym mogło dochodzić do wytrącania się inkrustacji nie jest możliwe jednoznaczne stwierdzenie, czy wytrącanie węglanów zachodziło w stanie równowagi z wodą otoczenia ramienic...”, zatem chyba główne założenie rekonstrukcji temperatury nie zostało spełnione.

Śledząc tok rozumowania Doktoranta, recenzent odniósł wrażenie istnienia pewnej niekonsekwencji w interpretacji wyników związanej z istnieniem lub brakiem procesu mieszania się wód. Zjawisko całkowitego wymieszania wód jest sugerowane na str. 101 w kontekście wyników $\delta^{18}\text{O}$ „...Należy zaznaczyć, iż różnica głębokości w przypadku tych zbiorowisk wynosiła tylko 1 m, więc nadal były to stanowiska stosunkowo płytkie, gdzie woda w odpowiednich warunkach mogła ulec całkowitemu w mieszaniu...”. Natomiast cała próba wyjaśnienia różnic w zapisie $\delta^{13}\text{C}$ w inkrustacjach węglanowych ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CARB}}$) badanych gatunków względem siebie i względem rozpuszczonego węgla w wodzie ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$) opiera się na hipotezie Doktoranta, że *Ch. tomentosa* pobiera węgiel z wody z nad zbiorowiska, lepiej wymieszanej, a *Ch. globularis* – z wody nadosadowej (naddennej), która „...nie jest poddawana intensywnemu mieszaniu...”. Trudno wyobrazić sobie mieszanie się jedynie izotopów tlenu a węgla już nie. Dodatkowo trzeba pamiętać, że w przypadku zjawiska niemieszania się wód przydennych pod zwartymi zbiorowiskami ramienic, okresowo może wystąpić zjawisko anoksji, a nawet metanogenezy, co diametralnie wpływa na skład izotopowy węgla, a procesy te ogóle nie były dyskutowane przez Doktoranta.

Pomimo zgłoszonych wątpliwości, recenzowana praca doktorska jest przykładem poprawnej pracy analitycznej z zakresu limnologii z wykorzystaniem analiz izotopowych. Recenzent docenia wkład pracy Doktoranta zarówno w badania terenowe, jak i analityczne i syntetyczne. Doktorant jasno sprecyzował cele, a następnie konsekwentnie je realizował, czyli analizował, porównywał i zestawiał wyniki, starając się odkryć wszelkie korelacje między nimi.

Za podstawowe osiągnięcie przedłożonej rozprawy recenzent uważa:

1) wykazanie istnienia porównywalnych tendencji w różnicach $\delta^{18}\text{O}$ węglanów i wody dla obu badanych gatunków ramienic; wartości $\delta^{18}\text{O}$ inkrustacji węglanowych stwierdzone dla *Ch. globularis* cechowały się niższymi wartościami niż stwierdzone dla *Ch. tomentosa*; 2) stwierdzenie różnic w wartościach $\delta^{13}\text{C}$ węglanowych inkrustacji pomiędzy badanymi gatunkami ramienic oraz względem wody oraz podjęcie próby wytłumaczenia tych różnic; 3) wykazanie różnic w wartościach $\delta^{13}\text{C}$ notowanych dla materii organicznej pomiędzy badanymi gatunkami ramienic; 4) analiza istnienia korelacji lub ich braku pomiędzy składem stabilnych izotopów węgla i tlenu, odpowiednio węglanów, wody, materii organicznej a składem gatunkowym i strukturą przestrzenną zbiorowisk z *Ch. tomentosa* i *Ch. globularis* oraz parametrami fizyczno-chemicznymi wody.

Pan mgr E. Pronin zastosował uzyskane wyniki badań i obserwacji do bardziej wnikliwej interpretacji składu izotopów trwałych węgla i tlenu inkrustacji ramienicowych oraz poszerzył stan wiedzy nt. wykorzystania ramienic w rekonstrukcjach paleoekologicznych. Recenzent uważa, że część recenzowanej rozprawy, po korektach i uzupełnieniu, zasługuje na opublikowanie.

3. Uwagi krytyczne

Przedstawione poniżej uwagi mają charakter ogólny i dotyczą układu pracy, zawartości poszczególnych rozdziałów lub generalnych cech rycin i tekstu:

- niefortunny tytuł pracy „Skład stabilnych izotopów $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{18}\text{O}$ w inkrustacjach...”, wg recenzenta tytuł mógłby brzmieć „Skład stabilnych izotopów węgla i tlenu w inkrustacjach...”, czyli zbędne jest użycie symboli $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{18}\text{O}$, ponieważ symbole te oznaczają stosunki zawartości ciężkiego izotopu do lekkiego izotopu danego pierwiastka w badanej próbce w odniesieniu do wzorca, a nie skład;
- właściwe byłoby umieszczenie w rozdz. 2. Teren badań, ryciny przedstawiającej dokładną lokalizację badanych stanowisk, w zwłaszcza czytelnych szkiców batymetrycznych jezior wykonanych w jednakowej skali z wyraźnym zaznaczeniem miejsc poboru próbek;
- w podrozdz. 3.1. Charakterystyka badanych gatunków ramienic, właściwe byłoby umieszczenie rysunków, fotografii obu opisywanych gatunków, w celu lepszego zobrazowania ich różnic morfologicznych;

- właściwe byłoby umieszczanie w tekście tabel i rycin zaraz po ich zacytowaniu, co korzystnie wpłynęłoby na przystępność pracy, a nie, np. ryc.1 cyt. na str. 16, w tekście jest zamieszczona dopiero na str. 19; tabela 11 cyt. na str. 52 – jest na str. 64; tabela 12 cyt. na str. 65 – jest na str. 81, itd.;
- tabele 3 i 4 zostały zamienione między sobą; recenzent ma nadzieję, że tylko w tekście, a nie przy wprowadzaniu danych do analiz statystycznych;
- recenzent nie widzi uzasadnienia, aby przy podawaniu wyników analiz statystycznych stosować przybliżenia do równych piątek i dziesiątek, np. wynik na rycinie 68% opisano jako „prawie 70%”, wynik 83,1% - jako niemal 85%;
- na wykresach podawany jest współczynnik korelacji r^2 , a w tekście – r
- w Dyskusji str. 86-88 jest kilka niepotrzebnych fragmentów – uwagi o cechach jezior, o stanie ekologicznym powinny być umieszczone np. przy opisie jezior; uwagi nt. klasyfikacji ekologicznych nie mają związku z prezentowaną tematyką i są zbędne;
- str. 92 – na skład izotopów trwałych tlenu mają jeszcze wpływ inne czynniki np. odległość od oceanu, wysokość n.p.m.

Uwagi szczegółowe

W recenzowanej pracy występuje szereg drobniejszych błędów, głównie redakcyjnych, z których część została wymieniona poniżej:

- błędna numeracja rozdziałów, brak rozdziału 5
- rycina 1 (str. 19), jest niewyraźna i nieczytelna; szkice batymetryczne są przedstawione w różnych skalach; nieprecyzyjne oznaczenie miejsc poboru próbek;
- rycina 15b (str. 55), przedstawiająca Wykresy rozrzutu [...] jest nieczytelna i zbyt chaotyczna, proponuję, aby strzałki pokazujące rozrzut wyników z danego jeziora były w tym samym kolorze co symbole stanowisk z tego jeziora;
- str. 30 - brak numeru cytowanej tabeli - tu : tabela 8;
- w recenzowanym egzemplarzu str. 91 znajdowała się pomiędzy stronami 96 i 97
- w spisie publikacji brak 12 pozycji: Coletta i in. 2002; Hayes 1993; Huon i Mojon 1994; Jones i in.1996; Krause 1981; Meyers 1994; Mook i in. 1974; O'Leary in.1992; Pełechaty i Pukacz 2013; Romanek i in. 1992; Rutkowski i in. 2009; van der Maarel 1979
- publikacja: Mendonça, R., i in. Bimodality in stable isotope composition facilitates the tracing of carbon transfer from macrophytes to higher trophic levels. Hydrobiologia, 710(1): p. 205-218. „pochodzi z 2013 roku, a nie 2010 (w tekście), czy 2012 (w spisie Literatury)
- różnice w cytowaniu daty publikacji Cyrwus A. 2008 (Tabela 1) czy 2009
- nie znaleziono w tekście cytowania 6 publikacji umieszczonych w spisie literatury, np. Ciecierska i in. 2013; Gałka i in. 2014; Jańczak 1996; Li i Ku 1997;Pukacz i in. 2014b; van den Berg i in. 1999;

- błędna pisownia nazwiska p. Krystyny Wyrwickiej, w tekście jest Wykrwicka
- Laboratorium Datowania i Badań Środowiskowych PAN nosi nazwę Laboratorium Datowania Izotopowego i Badań Środowiska ING PAN;
- kilka niefortunnych wyrażení np. „analizy hydrochemiczne próbek wody”- chodziło o analizę fizyczno-chemicznych cech wody, „najbardziej ujemne wartości”, „najbardziej pozytywne wartości”, „w celu jeszcze pełniejszego zobrazowania”..

4. Podsumowanie

Większość uwag recenzenta mieści się w ramach dyskusji naukowej lub ma charakter redakcyjny. Na podstawie przeprowadzonej recenzji stwierdzam, że praca doktorska pt. „Skład stabilnych izotopów $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{18}\text{O}$ w inkrustacjach węglanowych ramienic (*Characeae*) jako wskaźnik warunków środowiska jeziornego” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595, z późn.zm.). W związku z powyższym wnioskuję o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej autora Pana mgr Eugeniusza Pronina do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

J. Minoras