



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

ZAKŁAD TOKSYKOLOGII I BROMATOLOGII

Warszawa, 9 września 2024 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Podlesińskiej

Zatytułowanej: „Zastosowanie *Corophium* spp. (Amphipoda) w badaniach jakości osadów dennych Zatoki Gdańskiej oraz Martwej i Śmiałej Wisły”.

Wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Henryki Dąbrowskiej.

Recenzja została przygotowana na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk z dnia 24 lipca 2024 roku w oparciu o art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.), dotyczący wymagań stawianych rozprawom doktorskim.

Podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora jest rozprawa napisana w języku angielskim w formie klasycznej dysertacji. Praca liczy 166 stron i obejmuje: streszczenia w języku angielskim i polskim, wstęp literaturowy, opis miejsca badań, cele i hipotezy badawcze, opis stosowanych metod, wyniki, dyskusję oraz wnioski.

Badania ekotoksykologiczne ekosystemów mogą być prowadzone dwiema metodami. Bioindykacja obejmuje obserwację badanego środowiska, przede wszystkim ocenę występowania gatunków wrażliwych, a także ocenę bioróżnorodności. Natomiast analiza przy użyciu biotestów polega na poborze próbek i ocenie ich wpływu na specjalnie wyselekcjonowane organizmy testowe, które powinny spełniać szereg wymagań. Po pierwsze, powinny być dostępne dla badacza, łatwe do hodowli i/lub utrzymania w warunkach laboratoryjnych, wolne od chorób oraz stabilne genetycznie. Po drugie, powinny być wrażliwe na szerokie spektrum zanieczyszczeń i jednocześnie odporne na zmiany warunków środowiskowych (pH, zasolenie, temperatura). Po trzecie, ich reakcje testowe powinny być łatwe do obserwacji/pomiaru oraz powtarzalne. W 1996 roku P.M. Chapman w artykule opublikowanym w czasopiśmie *Ecotoxicology* (DOI: 10.1007/BF00119054) przedstawił tzw. Triadę Chapmana (Sediment Quality

Triad). Zalecił, aby badania ekotoksykologiczne osadów obejmowały: 1) badania chemiczne ich składu; 2) ocenę toksyczności; 3) ocenę struktury taksonomicznej.

Nawiązując do Triady Chapmana, Doktorantka podjęła próbę oceny jakości osadów Zatoki Gdańskiej oraz Martwej Wisły i Wisły Śmiałej stosując: biotest z organizmami z rodzaju *Corophium*, analizę chemiczną kilku grup zanieczyszczeń oraz analizę stanu zespołów makrozoobentosu. Zgodnie z tytułem rozprawy, najwięcej uwagi poświęciła analizie przydatności *Corophium* spp. jako organizmu reagującego na substancje toksyczne i odzwierciedlającego stan ekosystemów. W części teoretycznej pracy, Doktorantka zaprezentowała biologię i znaczenie ekologiczne obunogów (Amphipoda) oraz ich występowanie w Europie i w Polsce. Następnie, w obszernej tabeli ukazała przykłady zastosowania tych skorupiaków jako organizmów testowych w badaniach jakości osadów, a w kolejnych podrozdziałach przedstawiła typy biotestów oraz wykorzystywane w biotestach reakcje organizmów na niekorzystne warunki środowiskowe. Rozdział ten świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Autorki do badań doświadczalnych. Jednakże, dla lepszego zrozumienia części doświadczalnej pracy, różnic pomiędzy testem krótko-, a długoterminowym, we wstępie **powinien znaleźć się opis cyklu rozwojowego tych skorupiaków.**

W rozdziale 2 Autorka pracy scharakteryzowała obszar badawczy t.j. Zatokę Gdańską oraz Martwą Wisłę i Wisłę Śmiałą. Ukazała, że są to ekosystemy o silnej antropopresji, a jednocześnie intensywnie badane zarówno pod względem biologicznym, jak i chemicznym. Spośród wymienionych zanieczyszczeń wskazała przede wszystkim na substancje z grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych oraz metale, a w przypadku Wisły, dodatkowo na związki fluoru pochodzące z hałdy fosfogipsów. Tak zróżnicowany 'koktajl ksenobiotyków' daje podstawę do zastosowania metod biologicznych (biotestów) do oceny jakości ekosystemów. Większość przedstawionych zanieczyszczeń, po krótkim epizodzie w toni wodnej, ulega sorpcji do osadów, stąd prawidłowe jest zastosowanie biotestu wykorzystującego organizmy bentosowe.

W pierwszym etapie części doświadczalnej pracy Doktorantka dopracowała metody hodowli *Corophium* spp. Organizmy pobrano z czystych rejonów Zatoki Puckiej i hodowano w laboratorium Gdyńskiego Akwarium. Procedurę biotestu na *Corophium* spp. oparto na metodach Amerykańskiej Agencji Środowiska (US EPA) opracowanych dla obunoga *Leptocheirus plumulosus*. Nie wskazano jednak informacji, **które fragmenty procedury wymagały dostosowania do gatunków skorupiaków zastosowanych w pracy.** Przedstawiony w rozdziale 4.5 szczegółowy opis prowadzenia testu wymaga doprecyzowania:

- 1) Dlaczego zastosowano różnice w procedurach dla GoG (tabela 7) oraz MW&WS (tabela 8) dotyczące np. liczby organizmów w próbce, liczby powtórzeń, rodzaju pokarmu?
- 2) Czy, skoro oceniano wzrost (przyrost długości) organizmów, do testu wykorzystywano organizmy w tym samym wieku np. młode (tak, jak w teście Ostracodtoxkit F)?
- 3) Czy określano stosunek płci na początku testu, skoro występują zachowania agresywne u samców (strona 14) oraz analizowano procent samców na końcu testu?

Jako ważny element pracy uważam zastosowanie dużej liczby parametrów testowych: przeżywalności, wzrostu (przyrostu długości), odsetka samców, samic z jajami i form młodocianych, częstości linienia oraz unikania osadu. Takie podejście jest bardzo istotne zwłaszcza w analizach próbek środowiskowych, które zwykle nie powodują wystąpienia efektów ostrych, lecz subtelne, które także mogą mieć duży wpływ na populacje organizmów żyjących w danym środowisku. Jako drugi biotest zastosowano Ostracodtoxkit F, test opracowany przez MicroBioTest z Gandawy (Belgia) i zatwierdzony przez ISO (ISO 14371:2012). **Test ten jednak nie może być traktowany jako referencyjny**, do wyników którego Doktorantka mogłaby odnieść swoje wyniki, gdyż po pierwsze został zastosowany tylko w badaniach próbek z Wisły, po drugie jest zalecany w badaniach osadów słodkowodnych i nieznana jest odporność małżoraczków *Heterocypris incongruens* na zwiększone zasolenie wody i osadu.

Do analiz w niniejszej pracy wyznaczono 18 punktów poboru, 13 w Zatoce Gdańskiej oraz 5 na Wiśle, prawidłowo określających miejsca zróżnicowane pod względem potencjalnej toksyczności. W próbkach wykonano analizę granulometryczną oraz oznaczono szereg hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych: polichlorowane bifenyle, pestycydy chloroorganiczne, PBDE oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Spośród opisanych we wstępie jako istotne, toksyczne zanieczyszczenia w puli analizowanych związków niestety zabrakło metali (frakcji biodostępnej) i fluorków, które w części teoretycznej były opisane jako zanieczyszczenia istotne dla obszaru badań. Przedstawione na początku rozdziału 5 wyniki badań fizykochemicznych potwierdziły, że najbardziej zanieczyszczonymi próbkami były próbki z portów w Gdyni i Gdańsku. Ale moim zdaniem wyniki te wymagają bardziej pogłębionej analizy. Skoro trwałe zanieczyszczenia organiczne adsorbują się przede wszystkim na materii organicznej i najdrobniejszej frakcji, to ich zawartość powinna być znormalizowana w stosunku do poziomu tych parametrów.

Jak wspominałem wyżej badanie ekotoksyczności próbek na *Corophium* spp. obejmowało analizę szeregu parametrów istotnych dla funkcjonowania populacji. Dane liczbowe uzyskane podczas badań zostały porównane przy użyciu odpowiednich analiz statystycznych. W wielu przypadkach brak różnic statystycznych pomiędzy próbkami, a próbką kontrolną wynikał z bardzo wysokich wartości odchyłeń standardowych. Może to być istotną przeszkodą we wprowadzeniu tego testu do szerszej praktyki – ściśle określenie, czy dana próbka jest toksyczna, czy nie – jest jedną z podstawowych cech dobrego biotestu. Czy Doktorantka ma pomysł, jak można by obniżyć zmienność parametrów testowych? Wzrost organizmów w próbkach kontrolnych był niski w porównaniu do próbek badanych, a dodatkowo charakteryzował się znaczną zmiennością (Tabele 20, 21). Spowolniony wzrost ma także konsekwencje w odniesieniu do innych parametrów np. liczby linii. Przyczyny takich wyników powinny zostać szerzej przedyskutowane w pracy wraz z podaniem propozycji rozwiązania tego problemu.

Jednym z rzadziej stosowanych w badaniach osadów dennych przy użyciu skorupiaków bentosowych jest parametr nazwany w pracy „emergence” i tłumaczony jako „unikanie osadu”. Doktorantka zwróciła uwagę na ekologiczne znaczenie tego efektu testowego i powiązanie go z innymi efektami. Konieczność przemieszczenia się organizmu z miejsc zanieczyszczonych do czystych powoduje wzrost wydatku energetycznego i mniejszy przyrost organizmu. Parametr ten należy jednak wykorzystywać ostrożnie, biorąc pod uwagę inne przyczyny „unikania” czy „ucieczki”, np. niewłaściwy skład granulometryczny osadu i/lub brak najdrobniejszych cząstek odgrywających ważną rolę przy odżywianiu się tych skorupiaków.

W rozdziale 5.1.4 Autorka pracy podjęła próbę sumarycznej, liczbowej oceny różnych parametrów toksyczności wprowadzając „Total score points”. **Taki zbiorczy parametr jest istotny w podsumowaniach badań**, pomaga przy ich prezentacji zarówno naukowych, jak i w rutynowych badaniach monitoringowych. Niestety, próba ta była bardzo powierzchowna, nie przedstawiono, na jakiej podstawie opracowano ten zbiorczy parametr, dlaczego nadano takie, a nie inne wartości oraz wagi parametrom cząstkowym.

Aby porównać wrażliwość *C. volutator* z dwóch populacji: Kaczy Winkiel oraz Rzucewo, Doktorantka oceniła wpływ jonów kadmu na śmiertelność skorupiaków w teście toksyczności ostrej. Ten eksperyment uważam za niewłaściwie przeprowadzony z uwagi na:

1) zbyt małą liczbę stężeń w połączeniu ze zbyt dużymi różnicami pomiędzy stężeniami, w których obserwowana była częściowa toksyczność (10, 5, 2, 0,5 mg l⁻¹ Cd). W biotestach, w celu wyznaczenia wartości EC50, zalecane jest stosowanie przynajmniej 5 stężeń, a iloraz rozcieńczeń (czyli stosunek sąsiednich stężeń w szeregu) nie powinien być większy niż 2. Taki szereg rozcieńczeń zastosowano w pracy w teście Ostracodtoxkit F przy ocenie toksyczności jonów Cu.

2) zgodnie z zaleceniami US EPA metoda Probitowa nie powinna być stosowana do obliczania wartości LC50, gdy obserwowane są mniej niż dwie „częstkowe śmiertelności” (pomiędzy 10, a 90%).

Doktorantka podsumowała uzyskane wyniki w 11 szczegółowych punktach, **wyciągając wniosek o przydatności *Corophium* spp. do oceny jakości osadów.** Podkreśliła wpływ czynników naturalnych np. zawartości najdrobniejszych cząstek oraz materii organicznej na odpowiedzi testowe skorupiaka. Nie podała jednakże sposobu na kompensację tych czynników zakłócających wyniki testów. Za najważniejszy, rzadko dotąd wykorzystywany efekt, uznała reakcję „unikania osadu”, z uwagi na łatwość obserwacji, dodatnią korelację z poziomem zanieczyszczeń organicznych i ujemną korelację z przeżywalnością i tempem wzrostu, zwłaszcza dla *C. volutator*. Wskazała na różnice pomiędzy testowanymi gatunkami, nie wskazując, który z nich lepiej odpowiada wymaganiom testowym.

Drobne uwagi:

- Na fotografiach powinna być zaznaczona skala pomiarowa;
- Tabela 17: powinno być NO₂⁻ oraz NO₃⁻;
- Tabela 20: Co oznacza wartość Emergence 1.6 n ind.⁻¹?
- Skrótem OC oznaczono w pracy zarówno węgiel organiczny (organic carbon), jak i pestycydy chloroorganiczne (organochloride pesticides);
- Brak w piśmiennictwie następujących pozycji z tabeli 3: Dabrowska et al. 2010, Dabrowska et al. 2014, Dabrowska and Gora 2016;
- Niepełne piśmiennictwo: Falandysz J 1999; Ministerstwo Środowiska 216 (brak nr Dz.U.); Mioduszeński W 2008 (opinia?);

Podsumowując merytoryczną ocenę rozprawy uważam, że zaplanowany zakres badań został zrealizowany. Za najważniejsze osiągnięcia, a jednocześnie elementy mające wpływ na rozwój dziedziny naukowej, uważam:

1. Opracowanie i wdrożenie do praktyki laboratoryjnej biotestu z użyciem skorupiaka *Corophium* spp.;
2. Wskazanie, przy użyciu tego biotestu, najbardziej zanieczyszczonych osadów dennych w Zatoce Gdańskiej oraz wykazanie, że osady Martwej Wisły i Wisły Śmiałej nie są toksyczne dla organizmów bentosowych.

Mimo wielu zastrzeżeń, które przedstawiłem powyżej, zarówno do niepełnego opisu metod, jak i opisu wyników, uważam, że praca zawiera cenne wyniki i przyczyni się do rozwoju badań naukowych w szeroko rozumianym obszarze ekotoksykologii. Zawarte w części teoretycznej opisy stanowiły przesłanki do realizacji eksperymentów badawczych. Prace doświadczalne realizowane były w logicznym ciągu od przygotowania warsztatu badawczego, po eksperymenty ekotoksykologiczne.

Część teoretyczna pracy wskazuje na dobrą znajomość przez Doktorantkę aktualnych problemów badawczych w obszarze ekologii i ekotoksykologii oraz wyzwań stojących przed naukowcami.

Wniosek końcowy

Podjęty przez Doktorantkę temat stanowi aktualne zagadnienie badania stanu środowiska wodnego i wpisuje się w trend poszukiwania właściwych metod oceny ekotoksykologicznej osadów środowisk słonawych. Oceniana praca doktorska stanowi oryginalny wkład Doktorantki w rozwój nauki i spełnia wszystkie wymagania zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r (z późn. zm.). Mając na uwadze powyższe fakty składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Podlesińskiej i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Grzegorz Nałęcz-Jawecki