



dr hab. Andrzej Mikulski

Warszawa, 5 czerwca 2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Góreckiej pt.
„Adaptacje zooplanktonu do wybranych zanieczyszczeń w miejskich
zbiornikach wodnych”**

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Góreckiej przygotowana pod kierunkiem Pani dr hab. Adrianny Wojtal-Frankiewicz prof. UŁ w katedrze UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej Instytutu Ekologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego liczy sobie 148 stron. Obejmujące 29 stron Wprowadzenie zawiera rzeczowy, dobrze napisany wstęp merytoryczny wraz z uzasadnieniem podjęcia badań i ich zakresu, opisem celów, testowanych hipotez i metod zastosowanych dla ich weryfikacji. Zawiera też syntetyczny opis prac wchodzących w skład rozprawy oraz czytelnie wyartykułowane wnioski. Kolejna, licząca 100 stron część rozprawy to kopie opisanych we Wprowadzeniu czterech publikacji i jednego nieopublikowanego manuskryptu. Zawarte w rozprawie publikacje to jedna praca przeglądowa opublikowana w znakomitym czasopiśmie *Science of The Total Environment* (IF: 10,754; punkty MEiN: 200), oraz trzy prace badawcze opublikowane w bardzo dobrych czasopismach *Aquatic Sciences* (IF: 2,755; punkty MEiN: 100) i *Ecohydrology & Hydrobiology* (IF: 2,957; punkty MEiN: 100). Sumaryczna wartość IF wynosi więc 19,423, sumaryczna liczba punktów MEiN 500, a sumaryczna liczba cytacji według bazy Scopus na dzień składania recenzji 74. Jak na rozprawę doktorską to imponujące wyniki. Załączony na końcu manuskrypt również ma szansę zostać dobrze opublikowany.

Konstrukcja merytoryczna rozprawy jest moim zdaniem perfekcyjna. Zwornikiem całości jest praca przeglądowa (Szklarek S., Górecka A., Wojtal-Frankiewicz A. 2022. *The effects of road salt on freshwater ecosystems and solutions for mitigating chloride pollution – A review. Sci Tot. Env. 805:150289*), która w sposób czytelny prezentuje kompleksowo problem zasolenia wód powierzchniowych solą drogową, a więc zagadnienie, któremu poświęciła się Doktorantka w swojej pracy. W pracy tej Autorzy identyfikują ścieżki migracji chlorków z odśnieżanych ulic do wód, katalogują ich wieloaspektowy wpływ na organizmy i systemy biologiczne, oraz opisują metody radzenia sobie z zasoleniem, czy to poprzez ograniczanie ilości soli docierającej do środowiska, czy to poprzez usuwanie jej z niego. Za szczególnie ważne uważam zwrócenie przez Autorów uwagi na retencję soli w wodach gruntowych, co może powodować alimentację solą wód powierzchniowych przez cały rok, a więc także poza okresem jej bezpośredniego spływu z odladzanych powierzchni. W konsekwencji znaczne zasolenie może utrzymywać się przez cały rok także w zbiornikach przepływowych o niewielkim czasie retencji. W pracy pojawia się ciekawa sugestia związku odladzania ulic z możliwym pojawianiem się antropogenicznej meromiksji. Druga ważka obserwacja dotyczy negatywnego wpływu zasolenia, na szeroko pojętą jakość środowiska, w tym na funkcjonowanie ekosystemów, bioróżnorodność i ekspresję skutków nadmiernej eutrofizacji. Dodatkowym walorem opisywanej publikacji jest zamieszczona w niej duża liczba

atrakcyjnych wizualnie, znakomicie zaprojektowanych schematów, które mogą być w prosty sposób implementowane w wykładach akademickich i popularnonaukowych.

Problematyka kolejnych, tym razem eksperymentalnych prac włączonych do rozprawy stanowi naturalne rozwinięcie poszczególnych trzech części inicjującego ją przeglądu. Druga publikacja (Górecka A., Szklarek S., Frankiewicz P., Kukula K., Wojtal-Frankiewicz A. 2023. *Does winter application of road salt affect zooplankton communities in urban ponds?*; *Aquat. Sci.* 85(111)) zawiera analizę trzyletniego monitoring czterech miejskich zbiorników w różnym stopniu poddanych napływowi soli z odladzanych dróg. Autorka pobierała z każdego ze zbiorników co najmniej dwa razy w miesiącu próby wody i osadów. Analizowane było 12 zmiennych ilościowych opisujących warunki pogodowe oraz chemizm wody, a także struktura zespołu zooplanktonu. Co ważne przy analizie czynników determinujących dynamikę liczebności populacji uwzględniano przesunięcie w czasie czynników działających na populację i efektów ich działania, co bardzo uwiarygadnia wyniki.

Badania wykazały, że stężenie chlorku sodu w większości badanych stawów w okresie przedwiosennym przekraczało próg dla toksyczności ostrej, a potem sukcesywnie spadało utrzymując się w drugiej połowie roku na w miarę stabilnym, ale wciąż wysokim poziomie. Analiza dowiodła wpływu stężenia chlorków na zespół zooplanktonu, choć wpływ ten był w znacznej mierze maskowany innymi czynnikami składającymi się na specyfikę zbiorników.

Trzecia publikacja zamieszczona w rozprawie (Szklarek S., Górecka A., Salabert B., Wojtal-Frankiewicz A. 2022. *Acute toxicity of seven de-icing salts on four zooplankton species – is there an “eco-friendly” alternative?* *Ecohydrol. Hydrobiol.* 22: 589-597) testuje toksyczność czterech alternatywnych preparatów stosowanych w Polsce do odladzania dróg na czterech różnych organizmach planktonowych. Badania przeprowadzono przy użyciu komercyjnych testów na toksyczność. W konkluzjach autorzy stwierdzili, że organizmy w różny sposób reagowały na różne preparaty. Co najważniejsze, jedynie jeden z badanych preparatów wydawał się mniej toksyczny od używanego powszechnie chlorku sodu, a pozostałe, choć reklamowane, jako „ekologiczne”, albo nie odbiegały od niego toksycznością, albo były bardziej toksyczne. Jest to bardzo ważna konstatacja, która podważa wiarygodność deklarowanych przez producentów walorów pro-środowiskowych oferowanych produktów.

Czwarta publikacja (Szklarek S., Górecka A., Józwiak P., Wojtal-Frankiewicz A. 2023. *The effect of road salt (NaCl) treatment on the hatching success of Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus.* *Ecohydrol. Hydrobiol.* (w druku)) stanowi w gruncie rzeczy kontynuację badań poprzedniej badając wpływ soli drogowej na wykluwanie się form przetrwalnych dwóch należących do zooplanktonu gatunków: *Daphnia magna* i *Thamnocephalus platyurus*. Warto zaznaczyć, że oprócz prostej obserwacji wykluwania się osobników, dokonano poeksperymentalnej analizy zawartości ehippiów z użyciem elektronowego mikroskopu skaningowego. Eksperymenty miały dość skomplikowany układ symulując różne scenariusze ekspozycji na sól zarówno w zimnych jak i w ciepłych porach roku oraz analizując konsekwencji wcześniejszych ekspozycji. Jak można było przewidzieć, zasolenie miało wpływ na skuteczność wylęgania organizmów planktonowych z jaj przetrwalnych. Wyniki sugerują jednak, że wcześniejsza ekspozycja ehippiów nie musi mieć wpływu na późniejsze wykluwanie z nich jaj. Może to oznaczać, że efekt wczesnowiosennego zasolenia zbiornika może mieć ograniczony wpływ na zooplankton w sytuacji, gdy jej stężenie spadnie do momentu, gdy organizmy te wylęgają się masowo z banku jaj.

Piąta, nieopublikowana praca (Górecka A., Pieniążek A., Nebelska J., Szklarek S., Wojtal-Frankiewicz A.; *Odpowiedź antyoksydacyjna situ rozpierschłego (Juncus effesus) i oczeretu*

jeziornego (Schoenoplectus lacustris) na zanieczyszczenie solą drogową) poświęcona jest analizie możliwości wykorzystania dwóch krajowych gatunków roślin szuwarowych do odsalania środowisk wodnych. Główną część pracy stanowi analiza odporności badanych roślin na zasolenie przy wykorzystaniu aż pięciu niezależnych metod szacowania stresu oksydacyjnego: pomiaru peroksydacji lipidów, stężenia zredukowanego glutationu, oznaczenia aktywności katalazy i całkowitego nieenzymatycznego potencjału antyoksydacyjnego. Sprawdzone też tempo kumulowania w tkankach jonów sodowych. Wyniki pokazały, że oba badane gatunki są odporne na wzrost zasolenia i posiadają zdolność do kumulowania jonów sodowych na poziomie jaki uznałbym za wystarczający aby pomyśleć o ich implementacji do seminaturalnych systemów podczyszczających.

Moja ogólna ocena rozprawy doktorskiej Pani Aleksandry Góreckiej jest bardzo wysoka. Zasolenie jest problemem, który nawarstwia się od lat zarówno w Polsce jak i na świecie, a jego różne odsłony coraz częściej upośledzają istotnie funkcjonowanie zarówno ekosystemów, jak i ludzkich społeczności. Rozprawa zawiera niezwykle kompleksowe ujęcie problemu, a ogrom pracy towarzyszący zbieraniu materiału i jego analizie robi ogromne wrażenie. Załączone prace bez wątpienia znacząco wzbogacają wiedzę naukową dotyczącą przyczyn i skutków antropogenicznego zasolenia wód, a także pokazują, w jaki sposób można z tym zjawiskiem walczyć. Wszechstronność zastosowanych technik, począwszy od tych charakterystycznych dla tradycyjnych badań hydrobiologicznych, poprzez te związane z eksperymentami prowadzonymi zarówno na zwierzętach, jak i na roślinach, na nowoczesnych technikach molekularnych skończywszy, świadczy o bogatym warsztacie Doktorantki spełniającym z należytą oczekiwaniami, jakie można mieć, względem doktora nauk przyrodniczych. Cztery świetnie opublikowane prace w połączeniu z dobrym niepublikowanym manuskrypcem również z dużą należytą spełniają kryteria bardzo dobrego doktoratu. Jest jednak kilka problemów, które nieco tonują wyłaniający się z powyższego opisu bardzo entuzjastyczny obraz.

Po pierwsze spośród czterech opublikowanych wiodącym i pierwszym autorem trzech jest dr Sebastian Szklarek. Pani Aleksandra nie jest tam ani pierwszym ani ostatnim autorem, a Jej udział waha się od 10 do 25%. Jest Ona wiodącym i pierwszym autorem jednej opublikowanej pracy, tej opisującej trzyletnie badania terenowe, oraz nieopublikowanego manuskrypcu. Uważam, że trzyletnie intensywne badania terenowe wraz z ciekawymi i bogatymi metodycznie badaniami laboratoryjnymi stanowią wystarczający materiał na rozprawę doktorską, a udział Doktorantki w sensownych i związanych z Jej tematem innych badaniach wydaje się atutem, a nie obciążeniem. Trudno jednak oceniając rozprawę nie uznać, że zawiera ona nad wyraz znaczną, potwierdzoną formalnie kontrybucję innych badaczy. Z tą heterogennością w zakresie własności intelektualnych materiału wiąże się też być może nieadekwatność tytułu do zawartości rozprawy. Opisuje on ogólnie dwie, ewentualnie trzy z pięciu prac składających się na rozprawę, w tym jedynie jedną, w której rola Autorki jest wiodąca. Nic w tytule nie ma o zasoleniu, któremu przecież tak naprawdę poświęcona jest cała rozprawa.

Drugi problem dotyczy ogólnie genezy zasolenia w wodach powierzchniowych. Jest oczywistym, że Autorzy publikacji, zgodnie z deklaracją, zajmują się jedynie skażeniem solą drogową. W wielu miejscach jednak pisząc ogólnie o zasoleniu ograniczają się do niej, nie odnosząc się do znacznie ważniejszych źródeł soli w wodach powierzchniowych, takich jak wody pokopalniane, a także do naturalnych fluktuacji zasolenia spowodowanych wlewami wody morskiej do wód słodkich lub drenażem naturalnych wysadów solnych. Zwłaszcza ten ostatni przykład dziwi biorąc pod uwagę fakt, iż Łódź leży w pasie wysadów solnych

zasalających wody powierzchniowe (jak choćby Moszczenicę - Ziółkiewicz 2022). Całoroczne utrzymywanie się zasolenia w badanych przez Autorkę stawach może, podobnie jak przypadku wielu zbiorników w Warszawie, wynikać z naturalnego dopływu soli poprzez strefę hyporeiczną. Przed wyciągnięciem ostatecznych wniosków z wyników warto było, korzystając z pomocy hydrogeologa, sprawdzić taką możliwość. A jeśli została ona sprawdzona, pochwalić się tym faktem.

Trzecia ogólna uwaga dotyczy metodyki, a konkretnie wykorzystania komercyjnych testów do badania podatności zwierząt planktonowych na zasolenie. Jak pokazuje praktyka publikacyjna, taka procedura jest akceptowalna. Jest prosta i daje w miarę wystandaryzowane wyniki. Pytaniem otwartym jest to jak się one mają do rzeczywistości i jaka jest moc wnioskowania z tego typu eksperymentów. Nie bez powodu nadal w uznanych ośrodkach zajmujących się ekologią organizmów planktonowych utrzymuje się kosztowne hodowle klonów o znanym pochodzeniu i dobrze poznanych cechach. Każdy klon reaguje inaczej i przebadanie jednego, zwłaszcza takiego o nieznanym pochodzeniu, w dodatku stanowiącego efekt sztucznej selekcji, niewiele nam mówi o cechach gatunku, w tym o jego odporności na zasolenie. Nawet moje własne doświadczenia badawcze pokazują, że nie tylko klony pochodzące z miejsc o różnym zasoleniu reagują kompletnie inaczej na ten czynnik (Grzesiuk & Mikulski 2017), ale także zwierzęta z jednego klonu reagują całkiem inaczej w zależności od doświadczeń z zasoleniem, jakie miały uwalniające je matki (Mikulski & Mazurczak 2023). Ponadto, wbrew próbom zakliniania rzeczywistości przez producentów i dystrybutorów, zastosowane w prezentowanych badaniach testy mierzą *de facto* toksyczność ostrą, a więc LC50. To, że jakiś gatunek reaguje śmiertelnością na większe stężenia substancji toksycznej niż drugi wcale nie oznacza, że upośledzające dostosowanie zmiany fenotypu także pojawią się u niego przy wyższym jej stężeniu. Wnioskowanie o tolerancji na zasolenie gatunków na podstawie porównań LC50 wydaje się z punktu widzenia badań podstawowych archaiczne i mocno naciągane. W naturalnym środowisku zwierzęta eksponowane są prawie zawsze na niskie, chroniczne stężenia soli, a nie stężenia letalne. Czego zresztą dowiodły badania prezentowane w rozprawie.

Mam też do rozprawy kilka uwag szczegółowych. Rozumiem, że jej konstrukcja polegająca na omówieniu wszystkich hipotez, metodyki wszystkich prac, a następnie wyników i wniosków z rozbiciem na kolejne prace miała na celu podkreślenie spójności całości. Niestety bardzo utrudniło to zorientowanie się w tekście. Dużo łatwiejsze dla czytelnika (przynajmniej dla mnie) byłoby, po wprowadzeniu problematykę badań, zaprezentowanie całego materiału z rozbiciem na poszczególne prace (szczegółowe hipotezy, metody, wyniki i wnioski dla każdej pracy razem).

We wprowadzeniu Autorka użyła wadliwego terminu. Angielski zwrot „*intrinsic growth rate*” czyli „*r*”, tłumaczy się na język polski jako „wewnętrzne tempo wzrostu populacji” a nie „przyrost naturalny”. Przyrost naturalny (*rate of natural increase* - RNI) to pojęcie z demografii liczone zazwyczaj na podstawie prostej różnicy pomiędzy liczbą urodzin a liczbą zgonów.

Czytając pracę II nie do końca rozumiałem, w jaki sposób pobierano próby. Czy zooplankton pobierano czerpakiem (jeśli tak to jakim?), czy siatką planktonową (jeśli tak to jakościową czy ilościową?). Bez tej informacji trudno jest ocenić poprawność metodologiczną badań. Próbkę wody pobierano dwa razy w miesiącu, a zooplankton, co dwa tygodnie. To nie do końca to samo. Czy pobór dokonywano tego samego dnia? Czym pobierano próbki wody? Zooplankton pobierano ze strefy dopływu do zbiornika. Czy wodę do analiz z tego samego miejsca? Jeśli tak, to czy wpływająca woda nie czyniła odczytu mało reprezentatywnym dla

zbiornika? Jeśli nie, to czy zestawianie warunków chemicznych z dynamiką zespołu zooplanktonu jest wiarygodne?

Na rysunku 5b połączono punkty oznaczające zagęszczenia zooplanktonu dla poszczególnych stawów, co nie jest moim zdaniem uprawnione.

W pracy IV mój niepokój budzi wykorzystanie testu parametrycznego do danych z grupami, w których wszystkie wartości wynoszą 0. Nie jest tu możliwe spełnienie warunku o homogenności wariancji i o rozkładzie normalnym. Nie rozumiem też, w jaki sposób za pomocą analizy wariancji bez testu post-hoc Autorzy wyznaczyli istotność różnic pomiędzy grupami eksperymentalnymi (Rys. 2 i 3).

W pracy V Autorka zastosowała trudny i nieintuicyjny system kodowania grup eksperymentalnych. Proponuję to zmienić. Manuskrypt nie jest w fazie finalnej, ale już teraz warto radykalnie zwiększyć czcionkę na wykresach i w podpisie zaznaczyć, którego z opisanych w metodach testu dotyczą zaznaczone istotności. Warto też, przed pokazaniem istotności testów post-hoc, podać podstawowe parametry analizy wariancji.

Pomimo kilku mniej lub bardziej poważnych uwag krytycznych, nie mam wątpliwości, że Pani mgr Aleksandra Górecka spełniła kryteria wystarczające do przyznania stopnia doktora, a jej wiedza i wszechstronne umiejętności nabyte podczas prac nad doktoratem umożliwią Jej aktywną i efektywną pracę w nauce, jeśli oczywiście wybierze taką życiową drogę.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja Pani mgr Aleksandry Góreckiej spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Andrzej Mikulski