

Sopot, 09 luty, 2023

Prof. dr hab. Alicja Kosakowska  
Profesor emerytowany  
Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk  
Adres do korespondencji:  
[akosak@iopan.gda.pl](mailto:akosak@iopan.gda.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Sylwestrzak  
zatytułowanej: „ Effects of selected abiotic factors on Baltic microphytobenthic communities”  
(Oddziaływanie wybranych czynników abiotycznych na bałtyckie zbiorowiska mikrofitobentosu)**

**1. Ocena wstępna rozprawy doktorskiej**

Przedmiotem recenzji jest praca doktorska Pani mgr Zuzanny Sylwestrzak, która została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Adama Latały i Pani dr Aleksandry Zgrundo w Zakładzie Funkcjonowania Ekosystemów Morskich, Wydział Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego.

Przedmiotem badań były bałtyckie zbiorowiska mikrofitobentosu. W pracy dokonano oceny wpływu wybranych czynników abiotycznych takich jak jony miedzi(II), glifosat, ciecz jonowa oraz krótkookresowego nagłego wzrostu temperatury wody na strukturę zarówno ilościową i jakościową zbiorowiska mikrofitobentosu. Formacje mikrofitobentosu bałtyckiego w badaniach ekotoksykologicznych są stosunkowo mało rozpoznane.

Temat rozprawy doktorskiej zatem wpisuje się w ważną tematykę badań z zakresu biologii środowiska wodnego, ekotoksykologii i ekofizjologii morskiej w związku z postępującym zanieczyszczeniem środowiska morskiego zwłaszcza rejonów przybrzeżnych oraz zmian klimatycznych będących konsekwencją działalności człowieka.

Odpowiedź bałtyckiego zbiorowiska mikrofitobentosu tzw „sumaryczna” jak i jego analizowanych taksonów okrzemek na w/w ksenobiotyki, substancje z różnych grup chemicznych lub krótkookresowe zmiany temperatury, jej wzrost, są mało poznane i nie były dotąd badane w takim aspekcie, co świadczy o szczególnym znaczeniu badań zrealizowanych przez Doktorantkę. Podjęte w rozprawie zagadnienia wskazują na jej znaczący charakter i stanowią podstawę do dalszych interesujących badań.

**2. Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej**

Głównym celem pracy było scharakteryzowanie reakcji zbiorowisk bałtyckiego mikrofitobentosu wywołanej oddziaływaniem wybranych czynników pochodzenia antropogenicznego.

W pracy postawiono hipotezę badawczą:

„Wprowadzenie do środowiska zanieczyszczeń w postaci: chlorku miedzi (II), glifosatu (w formie Roundup®), cieczy jonowej [BMIM]Cl oraz krótkookresowy nagły wzrost temperatury wpływają na skład i strukturę zbiorowisk mikrofitobentosu Zatoki Gdańskiej, a zmiany te można oszacować poprzez obserwację komórek mikroorganizmów wchodzących w skład zbiorowisk mikrofitobentosu.”

Dotychczasowa wiedza na temat oddziaływania badanych ksenobiotyków w większości dotyczy monokultur glonów jednokomórkowych czy też hodowli co-cultures 2 gatunkowych. Natomiast brak jest pełnej informacji w tym zakresie w odniesieniu do mikrofitobentosu a zwłaszcza bałtyckiego.

W opracowaniu doktorantka w sposób wystarczający uzasadnia podjęcie tematu pracy oraz formułuje problem badawczy, nawiązuje do celów oraz zakresu badań. Przedstawia aktualny stan wiedzy na temat testowanych ksenobiotyków, opisuje ich charakterystykę chemiczną oraz ich oddziaływanie na środowisko wodne. Opisuje słabe i mocne strony wykorzystania mikroglonów - monokultur w testach toksykologicznych, oraz przedstawia zasadność/konieczność opracowania alternatywnych rozwiązań zastosowania formacji mikrofitobentosu do potencjalnej oceny skażeń środowiska morskiego zwłaszcza strefy przybrzeżnej

Główny cel badań został w pełni osiągnięty poprzez realizację celów i zadań cząstkowych. Składały się na nie kolejne wstępne etapy badań, takie jak:

- określenie optymalnego czasu ekspozycji w środowisku morskim matryc szklanych, z których pozyskiwano organizmy tworzące zbiorowiska mikrofitobentosu
- określenie parametrów hodowli mikroglonów - zoptymalizowanie warunków hodowli, dobór podłoża do prowadzenia testów ekotoksykologicznych na zbiorowiskach mikrofitobentosu

Następnie Doktorantka określiła strukturę mikrofitobentosu oznaczając jego skład gatunkowy, liczebność, biomasę oraz określiła reakcję zidentyfikowanych taksonów w formacji mikrofitobentosu na działanie miedzi(II), glifosatu, cieczy jonowej lub krótkookresowego wzrostu temperatury uwzględniając wskaźniki takie jak:

- przeżywalność przedstawicieli poszczególnych taksonów mikrofitobentosu,
- kondycja komórek przedstawicieli mikrofitobentosu w odniesieniu do stanu chloroplastów

Zmiany w morfologii chloroplastów Doktorantka określała na podstawie mikroskopowych obserwacji komórek kontrolnych jak i poddanych presji testowanych ksenobiotyków lub zmian tj. wzrostu temperatury.

Na tym etapie Doktorantka wykazała się dużą znajomością dostępnych analiz biologicznych, chemicznych oraz prowadzenia eksperymentów in situ i laboratoryjnych biotestów z udziałem mikrofitobentosu. Do analizy wpływu czynników uznawanych jako zanieczyszczenia chemiczne stosowano zbiorowiska mikrofitobentosu konserwowane płynem Lugola, a obserwacje przeprowadzano dla próbek zebranych w czasie  $t=0$  oraz po trzech i siedmiu dniach hodowli (publikacje 1, 2 i 3). Do oceny wpływu krótkookresowego wzrostu temperatury mikroskopowe obserwacje materiału okrzemkowego prowadzono inną techniką tj. w preparatach stałych z zastosowaniem żywicy Naphrax (publikacja IV). Doktorantka do oceny taksonomicznej zastosowała prawidłową metodykę zgodnie z wytycznymi Ramowej Dyrektywy Wodnej UE(RDW), w oparciu o rekomendacje dla Bałtyku; monitoring fitoplanktonu HELCOM COMBINE.

**Rozprawę doktorską stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.** Wyniki badań zostały opublikowane w czterech artykułach tj.:

**Sylwestrzak, Z.,** Zgrundo, A. & Pniewski, F. Copper chloride (II) effect on the composition and structure of marine microphytobenthic communities. *Environ Monit Assess* **194**, 443 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10106-8>

**Sylwestrzak Z.,** Zgrundo A. Pniewski, F. 2021. Ecotoxicological studies on the effect of Roundup® (glyphosate formulation) on marine benthic microalgae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), p.884. <https://doi.10.3390/ijerph18030884>

Sylwestrzak, Z., Zgrundo, A. Pniewski, F., 2022. Effects of the Ionic Liquid [BMIM] Cl on the Baltic microphytobenthic communities. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(9), p.1223. <https://doi.10.3390/jmse10091223>

Pniewski F., Sylwestrzak Z. 2018. Influence of short periods of increased water temperature on species composition and photosynthetic activity in the Baltic periphyton communities. *Biologia*, 73(11), 1067-1072. <https://doi.10.2478/s11756-018-0122-6>

Prace ukazały się w okresie 2018-2022 w renomowanych czasopismach znajdujących się na ministerialnej liście A (JCR) tj. **Environmental Monitoring and Assessment, International Journal of Environmental Research and Public Health, Journal of Marine Science and Engineering oraz Biologia**. Sumaryczna liczba punktów ministerialnych publikacji wynosi 220, a sumaryczny Impact Factor 11,39. Artykuły stanowiące rozprawę doktorską są efektem pracy zespołowej. Doktorantka w trzech z nich jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym z wiodącym jak wynika z załączonych oświadczeń udziałem polegającym na: zaplanowaniu koncepcji badań, zebraniu materiału badawczego (analizy terenowe), wykonaniu lub udział w analizach laboratoryjnych, zebraniu obserwacji, wykonaniu lub udział w analizach statystycznych, napisaniu maszynopisu pracy, odpowiedzi na recenzje pracy. W czwartym artykule Doktorantka jest drugim autorem. Jej udział w tym zakresie jest szacowany na 50%.

Tematyka badawcza wpisuje się w profil tych czasopism co tym samym zwiększa szanse na jej odbiór na forum międzynarodowym. Mimo stosunkowo krótkiego czasu od ukazania się tych artykułów dwie z nich są już cytowane co potwierdza ich znaczny potencjał w poszerzaniu wiedzy na temat odpowiedzi mikrofitobentosu bałtyckiego na antropogeniczne zanieczyszczenia chemiczne oraz zachodzące zmiany klimatyczne m.in. zmiany temperatury.

Przedłożona do recenzji praca doktorska składa się ze Streszczenia w języku angielski i języku polskim, czterech publikacji naukowych będących integralną częścią rozprawy oraz wykazu literatury (str.99-106) (References). Doktorantka w części końcowej do rozprawy dołączyła również swoje CV. Do każdej publikacji zostały dołączone oświadczenia dotyczące udziału współautorów w ich powstaniu.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych pierwszej publikacji należy charakterystyka ilościowa i jakościowa, pozyskanego w okresie lipca-sierpnia 2015 roku zbiorowiska bałtyckiego mikrofitobentosu, w czasie ekspozycji matrycy szklanej gł. 2m w rejonie strefy przybrzeżnej Zatoki Gdańskiej, poddanego działaniu miedzi (II) w stężeniu  $1,5 \times 10^{-5} \text{ g/dm}^3$  i  $2 \times 10^{-3} \text{ g/dm}^3$ . Stosowane stężenia miedzi były odpowiednio 10-1000 razy wyższe w odniesieniu do notowanych w środowisku naturalnym. Natomiast obserwowana reakcja zespołu peryfitonowego nie była jednoznaczna. W analizowanych zbiorowiskach dominowały okrzemki, stanowiły 86-99% wszystkich zliczonych komórek. W obecności testowanych stężeń miedzi(II), w 3 i 7 dniu ich oddziaływania, odnotowano nieznaczny spadek całkowitej liczebności testowanego zbiorowiska mikrofitobentosu; natomiast w przypadku poszczególnych taksonów obserwowano nasilenie zmiany ilościowej (spadek i wzrost liczebności) co w konsekwencji spowodowało zmiany w strukturze zbiorowiska mikrofitobentosu. Przeprowadzone testy z miedzią (II) dały Doktorantce podstawę do wyróżnienia w zbiorowisku bałtyckiego mikrofitobentosu, taksonów wrażliwych np. *Entomoneis paludosa* i *Navicula meniscus* (w tym przypadku obserwowano znacznie zahamowanie ich wzrostu), taksonów tolerancyjnych na działanie jonów miedzi (II), których wzrost był nieznacznie zahamowany jak *Bacillaria paxillifera*, *Tabularia fasciculata* i *Licmophora gracilis* ? oraz taksonów, których wzrost był stymulowany w obecności jonów miedzi(II) np. *Grammatophora marina*, *Navicula perminuta*.

Doktorantka przeprowadziła również mikroskopowe obserwacje stanu morfologicznego chloroplastów wybranych taksonów mikrofitobentosu w obecności zmiennych stężeń miedzi(II) w biotescie 3 i 7 dniowym. Na podstawie przeprowadzonej analizy chloroplastów Doktorantka wskazuje na ich zaawansowaną degradację notowaną najczęściej przy działaniu miedzi(II) w najwyższym stężeniu tj.  $2 \times 10^{-5}$  g/dm<sup>3</sup> np. u *Entomoneis paludosa* (90% zdeformowanych chloroplastów), *Tabularia fasciculata* (80%) i *Navicula meniscus* (taksony wrażliwe). Zmiany deformacyjne chloroplastów na poziomie ok 20% kontroli obserwowano u *Bacillaria paxillifera* i *Navicula perminuta* poddanych działaniu jonów miedzi(II). Brak zaburzeń w morfologicznym obrazie mikroskopowym chloroplastów obserwowano u *Grammatophora marina*, takson został określony jako niewrażliwy, odporny na działanie miedzi(II). Jednocześnie na podkreślenie zasługuje fakt, że obserwacje powyższe, z wyjątkiem okrzemki *Tabularia fasciculata* (takson określony jako wrażliwy), pozostają w zgodności z oceną intensywności wzrostu/wrażliwości komórek na działanie jonów miedzi(II).

#### Uwagi do publikacji I.

Rysunek – Fig.1 A i B - jest analogiczny jak w publikacji II z glifosatem. Brak jest informacji o źródle pochodzenia rysunków!! wykonanie własne??

Str.3

Wiersz 1, 2 i 5 błędnie zapisana jednostka stężenia soli bioennych; błąd w zapisie formy danego jonu oraz zapisie stężeń jonów miedzi w środowisku naturalnym i w jednostce stężenia;

błąd w zapisie sumarycznego wzoru chlorku miedzi(II)

Wiersz 8 i 17 strona prawa -błąd w zapisie stężenia Cu(II) oraz w jednostce stężenia

Wiersz.7 i 18 błędne cytowanie aktów prawnych np. Dz.U. z 2005 r. nr.8 poz.60 oraz str. 15 References poz- Ustaw D &Polskiej

Str 9 Fig.5 brak opisu osi y; tytuł Fig. 5 błędnie zapisane stężenie chlorku miedzi(II)

Fig. 5. A ad *Entomoneis paludosa* – brak zgodności z dnymi w Apendix 2 w Tabeli str 13

---- błąd w pisowni taksonu *Navicula meniscus*

Sugestia recenzenta: korekta tekstu w trakcie procesu publikacyjnego wymaga od Autorów szczególnej uwagi, wymaga większej staranności.

Do najważniejszych osiągnięć drugiej publikacji należy charakterystyka ilościowa i jakościowa, pozyskanego w okresie letnim, po 14 dniowej ekspozycji na podłożu szklanym w strefie przybrzeżnej Zatoki Gdańskiej, zbiorowiska mikrofitobentosu poddanego działaniu glifosatu w trzech stężeniach 0,042g/dm<sup>3</sup>; 0,85g/dm<sup>3</sup> i 8,5 g/dm<sup>3</sup> przez okres 3 i 7 dni.

W pozyskanych próbkach zbiorowiska mikrofitobentosu Doktorantka zidentyfikowała łącznie 58 taksonów, włączając w to 45 gatunków okrzemek, 9 cyjanobakterii, dwa taksony zielenic oraz reprezentujące Myozozoa *Peridinium* sp. i Haptophyta *Prymnesium* sp. Pełna lista zidentyfikowanych taksonów (w tym wg recenzenta 57, w publikacji podanych jest 8 gatunków cyjanobakterii ?) oraz liczebność tylko wybranych, 12 taksonów została udokumentowała w zestawieniu tabelarycznym w Appendix A ( Tab. A1 i Tabel 2).

W tym miejscu proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, jakie przyjęła kryteria do takiej dokumentacji szczegółowych wyników z biotestów.

Wyjściowa liczebność komórek w eksperymencie z glifosatem była na poziomie  $4,4 \times 10^4$ /cm<sup>3</sup>. Doktorantka wykazała negatywny wpływ glifosatu na testowane zbiorowisko bałtyckiego mikrofitobentosu zebranego w okresie letnim. I tak, po 3 dniach działania glifosatu w stężeniach 0,042g/dm<sup>3</sup>; 0,85g/dm<sup>3</sup> i 8,5 g/dm<sup>3</sup> oraz po 7 dniach stężeniach w stężeniach 0,042g/dm<sup>3</sup>; 0,85g/dm<sup>3</sup> notowano ok 30% obniżenie całkowitej liczebności taksonów w odniesieniu do próbki

kontrolnej. Najmniejszą liczebność, poniżej 50% próbki kontrolnej, odnotowano po trzecim dniu działania glifosatu w stężeniu  $8,5\text{g/dm}^3$ . Natomiast po 7 dniach glifosatu w najwyższym stężeniu tj,  $8,5\text{g/dm}^3$  powodował stymulację wzrostu w testowanej formacji mikrofitobentosu w porównaniu do całkowitej liczebności komórek w stężeniu glifosatu 10-krotnie niższym. W tym przypadku wzrost komórek był na poziomie ok 80% próbki kontrolnej.

Wyniki analiz przeprowadzonych przez Doktorantkę wskazują również na jakościową przebudowę struktury zbiorowiska mikrofitobentosu w obecności glifosatu.

W analizowanych zespołach mikrofitobentosu dominowały okrzemki, które stanowiły od 65 do 88% wszystkich zliczonych komórek (w roztworze kontrolnym w trzeciej dobie). Natomiast w siódmym dniu testu glifosatu w stężeniu  $8,5\text{ g dm}^3$  powodował obniżenie liczebności okrzemek do poziomu 40% ogólnej liczebności z jednoczesną przebudową struktury i dominacją ilościową taksonów z grupy cyjanobakterii. Liczebność cyjanobakterii w próbkach kontrolnych nie przekraczała 18%; natomiast w przypadku działania glifosatu w stężeniach  $0,042\text{ g /dm}^3$  i  $0,85\text{g/dm}^3$  sinice stanowiły od 26 do 35% ogólnej liczebności. Najwięcej cyjanobakterii ok 60% ogólnej liczebności obserwowano w siódmym dniu eksperymentu w roztworze o stężeniu  $8,5\text{ g/dm}^3$ .

Przeprowadzone testy pozwoliły Doktorantce na wyróżnienie w zbiorowisku letniego bałtyckiego mikrofitobentosu taksonów okrzemek o różnym stopniu wrażliwości na działanie glifosatu. Doktorantka wyróżnia 3 grupy organizmów: okrzemki niewrażliwe, tolearancyjne, np. *Tabularia fasciculata*, *Halamphora coffeaeformis* (= *H.coffeiformis*), okrzemki wrażliwe na działanie glifosatu *Bacillaria paxilifera*, *Diatoma tenuis*, *Melosira nummuloides* oraz okrzemki, których wzrost był stymulowany przez glifosatu takie jak *Navicula perminuta*. Doktorantka wykazała również w obecności glifosatu stymulację wzrostu cyjanobakterii: *Merismopedia* sp. i *Spirulina* sp. (nazwa taksonu zgodna z Figure 4; wg danych liczebności Tab. 2 Appendix A dane te odpowiadają *Spirulina subsalsa*). Doktorantkę proszę o wyjaśnienie.

Intensywny wzrost *Spirulina subsalsa* obserwowano w 7 dniu oddziaływania glifosatu w stężeniu  $0,85\text{ g/dm}^3$  (liczebność komórek na poziomie  $3,4 \times 10^3/\text{cm}^3$ ; liczebność w kontroli  $10^2/\text{cm}^3$ ). Natomiast najsilniejszy efekt stymulacji wzrostu *Merismopedia* sp. notowano w obecności glifosatu w najwyższym stężeniu  $8,5\text{ g/dm}^3$ . W tym przypadku liczebności sinicy *Merismopedia* sp. była na poziomie  $1,28 \times 10^4$  komórek/  $\text{cm}^3$  i był to takson dominujący i odpowiedzialny za przebudowę jego struktury jakościowej.

Testy przeprowadzone na zbiorowiskach mikrofitobentosu wykazały, że są one względne tolerancyjne na działanie glifosatu zawartego w preparacie Roundup®, w zakresie niskich stężeń. Bogactwo gatunkowe zbiorowisk mikrofitobentosu pozwoliło im na przebudowę ich struktury poprzez zastąpienie wrażliwych gatunków tolerancyjnymi.

Doktorantka przeprowadziła również mikroskopowe obserwacje stanu morfologicznego chloroplastów wybranych taksonów mikrofitobentosu w obecności zmiennych stężeń glifosatu w biotescie 3 i 7 dniowym. Na podstawie przeprowadzonej analizy chloroplastów Doktorantka wskazuje na ich zaawansowaną degradację notowaną najczęściej przy działaniu glifosatu w najwyższym stężeniu tj.  $8,5\text{g/dm}^3$  np. u *Halamphora coffeaeformis*, *Bacillaria paxilifera*, *Diatoma tenuis*, *Melosira nummuloides*. Jednocześnie na podkreślenie zasługuje fakt, że obserwacje powyższe, z wyjątkiem okrzemki *Halamphora coffeaeformis* (takson określony jako niewrażliwy), pozostają w zgodności z oceną intensywności wzrostu/wrażliwości komórek na działanie glifosatu.

Interesujące dane odnośnie obserwacji mikroskopowych chloroplastów uzyskała Doktorantka w przypadku cyjanobakterii *Merismopedia* sp. i *Spirulina* sp (nazwa taksonu zgodna z Figure 5; Natomiast wg Appendix A Tab.1 i Tab. 2 są podane taksony *Spirulina major* i *Spirulina subsalsa*). Doktorantkę proszę o wyjaśnienia w/w kwestii.

We wszystkich próbkach zarówno kontrolnych jak i poddanych działaniu glifosatu Doktorantka nie stwierdziła zaburzeń w morfologicznym obrazie mikroskopowym analizowanych cyjanobakterii.

W tym miejscu proszę Doktorantkę, o przedstawienie czy zidentyfikowane taksony w badanych zbiorowiskach letniego mikrofitobentosu bałtyckiego są /mogą być producentami toksyn a zwłaszcza organizmy, których wzrost jest stymulowany działaniem glifosatu i jakie mogą być tego potencjalne konsekwencje ekologiczne.

Proszę również Doktorantkę o rozwinięcie zagadnienia odnośnie trwałości glifosatu w środowisku wodnym, jego degradacji, powstających metabolitach i skutkach ich obecności w środowisku i czy taka degradacja mogła mieć miejsce w próbkach podczas przeprowadzonych biotestów z mikrofitobentosem. Czy glifosat w postaci min. preparatów handlowych Roundap może być dodatkowym źródłem fosforu dla taksonów tworzących zbiorowiska mikrofitobentos?

Do najważniejszych osiągnięć trzeciej publikacji należy charakterystyka ilościowa i jakościowa, pozyskanego, po 14 dniowej ekspozycji na podłożu szklanym w strefie przybrzeżnej Zatoki Gdańskiej 2015 roku, zbiorowiska mikrofitobentosu poddanego działaniu cieczy jonowej (Ionic liquids- IIs) w formie chlorku 1-butylo-3-metyloimidazolowego [BMIM]Cl w dwóch stężeniach  $1,13 \times 10^{-3} \text{ g/dm}^3$  i  $1,75 \times 10^{-2} \text{ g/dm}^3$  przez okres 3 i 7 dni.

W pozyskanych próbkach zbiorowiska mikrofitobentosu Doktorantka zidentyfikowała łącznie 46 taksonów mikroglonów, włączając w to 35 gatunków okrzemek, 6 cyjanobakterii, dwa taksony zielenic oraz przedstawiciela bruzdnic *Peridinium* sp. i Haptophyta *Prymnesium* sp. Pełna lista zidentyfikowanych taksonów została udokumentowana w zestawieniu tabelarycznym w Appendix A (Tab. A1).

Wyjściowa liczebność komórek w eksperymencie z testowaną cieczą jonową była na poziomie  $3,8 \times 10^4 / \text{cm}^3$ . Doktorantka wykazała, że ciecz jonowa w formie chlorku 1-butylo-3-metyloimidazolowego powoduje obniżenie całkowitej liczebności w zbiorowisku mikrofitobentosu bałtyckiego. Po 3-ch dniach hodowli obserwowano 47% spadek liczby komórek mikroglonów w obecności [BMIM]Cl w stężeniu  $1,13 \times 10^{-3} \text{ g/dm}^3$  i ok 20% w stężeniu  $1,75 \times 10^{-2} \text{ g/dm}^3$  [BMIM]Cl w odniesieniu do próbki kontrolnej. W siódmym dniu testu w obecności [BMIM]Cl w obu badanych stężeniach obserwowano, odpowiednio, od 23 do 26% obniżenie liczebności komórek mikroglonów w formacji mikrofitobentosu w odniesieniu do kontroli.

Zbiorowiska mikrofitobentosu były silnie zdominowane przez okrzemki, które stanowiły od 70% do 90% wszystkich zidentyfikowanych taksonów. Liczebność cyjanobakterii w hodowlach kontrolnych nie przekraczała 10% (najwięcej notowano w trzecim dniu eksperymentu). W przypadku działania cieczy jonowej [BMIM]Cl przez okres 7 dni w stężeniach  $1,13 \times 10^{-3} \text{ g/dm}^3$  i  $1,75 \times 10^{-2} \text{ g/dm}^3$  sinice stanowiły odpowiednio 23 i 28% ogólnej liczebności mikroglonów. Liczebność *Prymnesium* sp podczas trwania biotestu nie przekraczała 0,3% a *Peridinium* sp. 0,6% całkowitej liczby taksonów.

Analiza podobieństw SIMPER wykazała duże podobieństwo w składzie zbiorowiska. Na początku eksperymentu (punkt K\_0,) formacja charakteryzowała się największą liczbą gatunków. W trzecim dniu biotestu, zaobserwowano zwiększony udział sinic. Jednak na podstawie analizy PCA nie było możliwe wytyczenie grup organizmów, które były jednoznacznie wrażliwe lub tolerancyjne

Na podstawie analizy SIMPER, analizując procentowy udział zidentyfikowanych taksonów w całkowitej liczebności komórek w testowanym zbiorowisku mikrofitobentosu poddanym działaniu ils Doktorantka wyróżniła 8 najważniejszych gatunków w badanym zbiorowisku. I tak, największy 36% udział w całkowitej liczebności komórek miała okrzemka *Bacillaria paxillifera* w 3 dniu hodowli próbka kontrolna i kolejno *Tabularia fasciculata* stanowiła 23 procentowy udział

w wyjściowej liczebności – próbki 0), *Diatoma vulgaris* – stanowiła od 9-17% (podczas trwania testu), *Melosira nummuloides* stanowiła 20% udziału w 7 dniu testu w próbkach kontrolnych. W przypadku *Navicula perminuta* obserwowano istotne zmiany; w początkowej fazie testu liczebność tego taksonu była na poziomie 8%, natomiast po 7 dniach oddziaływania II w obu testowanych stężeniach obserwowano ok 2-krotny wzrost liczby komórek *N. perminuta*. W przypadku okrzemki *Cylindrotheca closterium* najwyższy udział w liczebności notowano w początkowej fazie testu, był on na poziomie 13% po czym w kolejnych dniach hodowli notowano obniżenie do 8%. Największy udział okrzemki *Navicula gregaria* na poziomie 6% notowano w obecności IIs w niskim stężeniu  $1,13 \times 10^{-3}$  g/dm<sup>3</sup>. Udział *Spirulina major*, przedstawiciela cyjanobakterii nie przekraczał 1% podczas trwania

Doktorantka wykazała, że badana imidazolowa ciecz jonowa BMIM Cl w większości taksonów powodowała statystycznie istotną redukcję ich liczebności w testowanym zbiorowisku bałtyckiego mikrofitobentosu.

Wyjątek stanowiły dwa taksony tj. okrzemka *Navicula perminuta* i *Navicula ramosissima*. W tym przypadku w obecności IL notowano zwiększenie liczebności w porównaniu do próbek kontrolnych. W związku z tym zostały one zidentyfikowane jako gatunki tolerancyjne. Liczebność *N. perminuta* w próbkach kontrolnych po 7 dniach hodowli zmniejszyła się o ok. 90% w stosunku do wyjściowej liczebności K0, podczas gdy w obecności cieczy jonowej w obu stężeniach odnotowano liczebność na poziomie około 89% i była ona zbliżona do początkowej liczebności.

Natomiast w 3 dniu testu w obecności [MIM]Cl zarówno w stężeniu  $1,13 \times 10^{-3}$  g/dm<sup>3</sup> jak i  $1,75 \cdot 10^{-2}$  g/dm<sup>3</sup>, notowano stymulację wzrostu. Liczebność komórek była, odpowiednio, na poziomie 140% ok 300% próbki kontrolnej. Siódmego dnia hodowli w obecności IL obserwowane nastąpił aż dziesięciokrotny wzrost liczebności komórek dla tego taksonu w porównaniu z wariantem kontrolnym.

Podobna stymulację wzrostu odnotowano w przypadku *Navicula ramosissima* w trzecim dniu oddziaływania II w niskim stężeniu. Po czy po 7 dniach hodowli nastąpił znaczny spadek liczebność i wynosiła tylko 45% i 64% próbki kontrolnej w zależności od stężenia [BMIM]Cl.

Obecność cieczy jonowej [BMIM]Cl w środowisku wzrostu mikrofitobentosu bałtyckiego powodowała w różnym stopniu obniżenie liczebności najważniejszych taksonów zbiorowiska tj. *Bacillaria paxillifera*, *Melosira nummuloides*, *Tabularia fasciculata* i *Cylindrotheca closterium*. Najsilniejszy efekt zahamowania wzrostu Doktorantka odnotowała w przypadku *Cylindrotheca closterium*. Po 7 dniach hodowli w obecności IL w stężeniu  $1,13 \times 10^{-3}$  g/dm<sup>3</sup> w wykazała brak żywych komórek a w wyższym stężeniu IL  $1,75 \times 10^{-2}$  g/dm<sup>3</sup> poziom liczebności oszacowała na 14% w odniesieniu do próbki kontrolnej.

Przeprowadzone testy pozwoliły Doktorantce na wyróżnienie w zbiorowisku letniego bałtyckiego mikrofitobentosu taksonów okrzemek o różnym stopniu wrażliwości na działanie cieczy jonowej w formie chlorku 1-butylo-3-metyloimidazolowego [BMIM]Cl. Doktorantka wyróżnia 3 grupy organizmów w zależności od ich reakcji na działanie II : okrzemki niewrażliwe, tolerancyjne i organizmy wrażliwe.

Doktorantka przeprowadziła również mikroskopowe obserwacje stanu morfologicznego chloroplastów wybranych taksonów fitomikrobentosu w obecności zmiennych stężeń cieczy jonowej [BMIM]Cl w bioteście 3 i 7 dniowym. Na podstawie przeprowadzonej obserwacji mikroskopowej chloroplastów Doktorantka wskazuje na ich zaawansowaną degradację notowaną najczęściej przy działaniu cieczy jonowej w najniższym i w najwyższym stężeniu tj.  $1,13 \times 10^{-3}$  i  $1,75 \times 10^{-3}$  g/dm<sup>3</sup> np. u *Tabularia fasciculata* (30-40% uszkodzenie chloroplastów po 3 dnia działania IL i i 50% po 7 dniach), u *Melosira nummuloides* (od 0-16% w K3 i K7; 30-40% po 7 dniach działania IL),

u *Bacillaria paxillifera* (15% do 27%). Największe zmiany w morfologii chloroplastów Doktorantka obserwowała u *Cylindrotheca closterium*. Stopień degradacji oceniła na 40-85%, nie obserwowała powyższych zmian w hodowlach w obecności [BMIM]Cl w stężeniu  $1,75 \times 10^{-3} \text{ g/dm}^3$ . Jednocześnie na podkreślenie zasługuje fakt, że obserwacje powyższe, pozostają w zgodności z oceną intensywności wzrostu/wrażliwości komórek w zbiorowisku mikrofitobentosu na działanie cieczy jonowej.

#### Uwagi Publikacja nr 3

Błędy zapis stężenia cieczy jonowej [BMIM]Cl – [  $1,13 \cdot 100^{-3} \text{ g dm}^{-3}$  ] [  $1,75 \times 100^{-2} \text{ g dm}^{-3}$  ] w tekście na str. 9,10,11 oraz w tytułach rysunków Figure 7

Rys.2 jest analogiczny jak w pracy IV opublikowanej w 2018r brak źródła pochodzenia rysunku, jako cytowany?

Przyjęcie oceny kondycji stanu morfologicznego chloroplastów w komórkach mikrofitobentosu (publikacja 1,2 i 3) jako odpowiedź na działania badanych ksenobiocyków nie jest powszechnie stosowanym kryterium w testach z mikroglonami. Uważam, że takie podejście Doktorantki jest godne uwagi i pochwały, ale na tym etapie badań traktuję je jako badania wstępne wnoszące wkład w rozwój badań środowiska wodnego, metodologii w zakresie algologii i stanowiących podstawę do dalszych badań metodycznych. Zastosowanie tylko mikroskopu świetlnego może być nie wystarczające do oceny początkowego stadium zaburzeń tzw. subtelnych zmian zwłaszcza, że również zmiany w budowie morfologicznej chloroplastów obserwowano w próbkach kontrolnych.

W publikacjach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej (oznaczonych numerami 1, 2, 3) Doktorantka w części metodycznej publikacja 2 ( glifosat) pkt. 2.3. Analizy mikroskopowe zamieściła zdjęcia mikroskopowe 5-ciu wybranych taksonów okrzemek przedstawiające komórki z prawidłowymi i zniekształconymi chloroplastami (Figure 2). Doktorantka nie precyzuje opisu w/w zdjęć, nie podaje skali wielkości.

W tym miejscu proszę Doktorantkę o wyjaśnienie: uszczegółowienie jakich próbek dotyczą zamieszczone zdjęcia: jakie było stężenie glifosatu/ dzień trwania biotestu.

Doktorantka w publikacjach będących przedmiotem Jej rozprawy doktorskiej nie zamieściła pełnej dokumentacji zmian obserwowanych w strukturze chloroplastów w komórkach mikrofitobentosu poddanych działaniu wybranych ksenobiocyków będących przedmiotem Jej badań. Dużą wartością dodaną prac byłoby zamieszczenie dobrej jakości zdjęć komórek z pod mikroskopu świetlnego z oznaczonymi chloroplastami i ich charakterystyką ilościową i jakościową, z podaniem stężenia i czasu działania ksenobiocyku. W tym miejscu poproszę Doktorantkę o przybliżenie charakterystyki chloroplastów dominujących grup taksonów w zbiorowisku letniego mikrofitobentosu bałtyckiego.

W części metodycznej każdej w publikacji 1,2,3,4 Doktorantka podaje stężenia soli biogennych w wodzie morskiej. Brak jest informacji z jakiego źródła dane te pochodzą tj czy są wynikiem analiz? Czy są to dane literaturowe.

Brak jest w publikacjach jasnej i pełnej informacji o terminie pobierania próbek środowiskowych.

W czwartej publikacji Doktorantka wraz z współautorem oceniła wpływ krótkookresowych zmian temperatury (ok.  $4^{\circ}\text{C}$  powyżej średniej letniej temperatury) na formację mikrofitobentosu bałtyckiego pozyskanego w lipcu 2015r po tygodniowej ekspozycji matryc szklanych na gł. 2m w wodach przybrzeżnych Zatoki Gdańskiej, punkt pomiarowy rejon moło Sopot.

W pierwszym etapie pracy określono wpływ wzrostu temperatury na ilościową i jakościową strukturę badanego zespołu peryfitonu. W kolejnym analizowano aktywność fotosyntetyczną (wyznaczając



parametry fluorescencji chlorofilu a: Fv/Fm- maksymalna wydajność PSII; NPQ-niefotochemiczne wygaszanie itd.) oraz skład barwników fotoochronnych cyklu diadinoxantofilowego w zbiorowisku mikrofitobentosu.

Zgodnie z deklaracją Doktorantki przedstawioną w Streszczeniu wyniki w tej publikacji dotyczyć będą głównie pierwszego etapu pracy.

Wyjściowa biomasa zbiorowiska mikrofitobentosu, po okresie aklimatyzacji, mierzona stężeniem chlorofilu a, była na poziomie ok.  $0,36 \mu\text{g chl}/\text{cm}^3$ . Nie zaobserwowano istotnych zmian w całkowitej biomacie po 3-ch dniach inkubacji w temperaturze  $18^\circ\text{C}$  w porównaniu do stężenia chla w próbkach w czasie  $t=0$ . W przypadku inkubacji peryfitonu w wyższej temperaturze  $23^\circ\text{C}$  notowano nieznaczne obniżenie stężenia chla ( $0,30 \pm 0,06 \mu\text{g chl}/\text{cm}^3$ ) w porównaniu do próbek inkubowanych w temp.  $18^\circ\text{C}$ . Jednak obserwowane zmiany były nieistotne statystycznie (test t-Studenta;  $p > 0,05$ ).

Doktorantka w tej publikacji wykazała, że krótkookresowy wzrost temperatury powoduje zmiany ilościowe i jakościowe w strukturze letniego mikrofitobentosu bałtyckiego.

Spośród zidentyfikowanych grup taksonomicznych w zbiorowisku mikrofitobentosu największy ok.90% udział w biomacie stanowiły okrzemki oraz w kolejności cyjanobakterie. Doktorantka wykazała ok.2,5 krotny wzrost biomasy cyjanobakterii w badanym zbiorowisku jako reakcję na krótkookresowy wzrost temperatury, z 3,8 % do 8,4%, odpowiednio  $18^\circ\text{C}$  do  $23^\circ\text{C}$ . Łącznie w próbkach zidentyfikowano 29 taksonów. Wśród zidentyfikowanych taksonów, cyjanobakterie były reprezentowane przez trzy rodzaje: *Anabaena*, *Merismopedia* i *Spirulina*. Zidentyfikowane taksony zostały scharakteryzowane również pod względem klas ich wielkości S,M,L.

Pozostałe taksony to okrzemki, których dwanaście stanowiły ponad 90% liczby komórek. Skład okrzemek w obu wariantach doświadczenia był zdominowany przez taksony średniej wielkości ( $1000\text{--}5000 \mu\text{m}^3$ ), 84 i 77,5% odpowiednio przy  $18^\circ\text{C}$  i  $23^\circ\text{C}$ .

Natomiast w podwyższonej temperaturze udział okrzemek mniejszych (poniżej  $1000 \mu\text{m}^3$ ) znacznie wzrósł od ok. 7% do 17,7% (test t-Studenta;  $p > 0,05$ ). Okrzemki o większym rozmiarze ( $>5000 \mu\text{m}^3$ ) występowały rzadziej i liczebność pozostawała względnie stała.

Najbardziej liczne były gatunki: *Bacillaria paxillifera*, *Diatoma moniliformis*, *Fragilaria fasciculata*, *Navicula perminuta*, *Navicula ramosissima*.

Wzrost temperatury do  $23^\circ\text{C}$  nie wpływał na zmianę liczebności okrzemki, *Bacillaria paxillifera*. Jej udział w całkowitej liczebności szacowany był na ok.24%. W przypadku taksonów *Fragilaria fasciculata* i *Navicula ramosissima*, podwyższona temperatura oddziaływała negatywnie na ich wzrost powodując obniżenie liczebności komórek w zbiorowisku mikrofitobentosu. Natomiast wzrost komórek *Diatoma moniliformis* i *Navicula perminuta* był stymulowany podwyższoną temperaturą i ich ilość wzrosła (test t-Studenta,  $p < 0,05$ ).Doktorantka wykazała potwierdziła, że krótkie okresy podwyższonej temperatury istotnie wpływają na strukturę i funkcjonowanie peryfitonu bałtyckiego. W tym miejscu proszę Doktorantkę o wyjaśnienie Czy obserwowane zmniejszanie rozmiarów komórek ich miniaturyzacja w zbiorowisku mikrofitobentosu w wyniku stresu temperaturowego może mieć miejsce w środowisku morskim?

#### Uwagi publikacja 4

Fig.1; Fig.3 brak opisu osi y

str. 1069 Błąd w pisowni *B. paxillifera* ostatni wiersz tekstu

str.1072 poz. literaturowa Sylwestrzak i in. 2018, brak nazwy czasopisma

Uwagi Streszczenie str.24 Fig.1 Zdjęcia mikroskopowe A i B - *Bacillaria paxillifera*, *Navicula perminuta*, *Melosira nummuloides* komórki kontrolne i komórki ze zmienionymi chloroplastami – brak podanej skali wielkości oraz nie podano jaki badany czynnik antropogeniczny jest przyczyną tej zmiany; str.8 cytowana praca Sylwetrzak 2016– w wykazie literatury brak podanego czasopisma

Zastanawiający jest, obserwowany w próbkach kontrolnych (publikacja 1,2,3,4), efekt obniżania liczebności poszczególnych taksonów i przebudowa struktury zbiorowiska mikrofitobentosu w trakcie trwania biotestów. Nasuwa się pytanie czym ta reakcja w zbiorowisku mikrofitobentosu może być spowodowana. W tym miejscu proszę Doktorantkę o podjęcie dyskusji w tym zakresie.

Jednym ze sposobów kontroli jakości środowiska jest jego ocena na podstawie zmian w strukturze gatunkowej biocenozy. Stosowane metody są oparte na obserwacji i identyfikacji gatunków wskaźnikowych i wnioskowaniu na tej podstawie o warunkach abiotycznych. Należy jednak brać pod uwagę fakt, że wrażliwość na działanie ksenobiotyków może się bardzo różnić u grup organizmów i między gatunkami, a nawet u różnych szczepów tego samego gatunku.

Proponowane przez Doktorantkę zastosowanie bałtyckiego zbiorowiska mikrofitobentosu w badaniach ekotoksykologicznych w ocenie stanu środowiska jest w pełni uzasadnione. Jednakże polemizowałabym, że proponowana metodyka jest prosta i jednoznaczna i może być zaproponowana w rutynowym monitoringu środowiska morskiego. Uważam, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią cenną wskazówkę do dalszych badań również metodycznych oraz do poszukiwania nowych parametrów m.in. z zakresu biologii molekularnej, cytofizjologii, biochemii w ocenie morskiego mikrofitobentosu na działanie ksenobiotyków.

Treść załączonego Streszczenia stanowi jednolitą formę opisową, w którym Doktorantka wprowadza w tematykę badań i uzasadnia ich podjęcie oraz przedstawia hipotezę i cele badawcze, ogólną metodykę badań, uzyskanych w rozprawie doktorskiej wyników, ich analizę i dyskusję (liczne cytowania innych autorów) oraz ich podsumowanie.

W tym miejscu oczekiwałabym kilku precyzyjnie sformułowanych i wypunktowanych wniosków. Doktorantkę proszę o ich przedstawienie.

### **3. Ocena końcowa**

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Sylwestrzak uważam, że Doktorantka podjęła się zbadania bardzo istotnego tematu badawczego związanego z charakterystyką jakościową i ilościową zbiorowiska bałtyckiego mikrofitobentosu poddanego presji wybranych ksenobiotyków, substancji z różnych grup chemicznych, lub zmian temperatury w kontekście oceny stanu jakości środowiska morskiego. Dzięki różnorodnemu i otwartemu podejściu oraz zastosowaniu określonych technik badawczych praca doktorska wnosi istotny dorobek do rozwoju biologii, ekologii i ekotoksykologii organizmów peryfitonowych.

Po zapoznaniu się z przedstawioną rozprawą doktorską Pani mgr Zuzanny Sylwestrzak stwierdzam, że dysertacja spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017poz.1789 z póź, Zm.). W związku z powyższym zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Zuzanny Sylwestrzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Alicja Kosakowska