

prof. dr hab. Dariusz Jakubas

Katedra Ekologii i Zoologii Kręgowców

Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Kucharskiej pt.

„Trends and implications of lead and mercury exposure in Black Storks and Mute Swans
sampled in Poland”

1. Podstawowe podstawowych dane o Doktorantce

1.1. Data uzyskania tytułu magistra oraz nazwa jednostki organizacyjnej, w której tytuł ten był nadany;

Tytuł magistra uzyskała 28.10.2014 na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie w Instytucie Nauk o Zwierzętach

1.2. Informacja, czy kandydat ubiegał się uprzednio o nadanie stopnia doktora, w tym – o ile wynika to z dokumentacji sprawy – informacja o przebiegu i zakończeniu wcześniejszego postępowania;

nie ubiegała się

1.3. Przebieg pracy naukowo-zawodowej (miejsce pracy, zajmowane stanowiska);

W 2015 roku rozpoczęła studia doktoranckie z biologii na Uniwersytecie Pedagogicznym im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie. Ukończyła je 30.09.2019.

2. Informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej:

2.1. Tytuł rozprawy doktorskiej stanowiącej podstawę ubiegania się w aktualnym postępowaniu o nadanie stopnia doktora;

Trends and implications of lead and mercury exposure in Black Storks and Mute Swans
sampled in Poland

3. Ocena pracy doktorskiej

3.1. ocena układu rozprawy doktorskiej, w tym informacje o jej poszczególnych częściach składowych:

Praca napisana jest w języku angielskim. Składa się na nią seria 4 powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (2 w *Environmental Pollution* i 2 w *Science of the Total Environment*). Oprócz serii artykułów praca składa się z abstraktu w języku angielskim i polskim, omówienia 4 prac wchodzących w skład dysertacji (zawierające wstęp, cele i hipotezy, omówienie i dyskusję wyników oraz konkluzje) oraz omówienie dodatkowej działalności naukowej Doktorantki. Układ rozprawy jest prawidłowy i logiczny. Zabrakło mi jednak w rozprawie dwóch elementów: 1) oświadczeń współautorów pomimo faktu, że artykuły wchodzące w skład dysertacji są wieloautorskie, oraz 2) suplementów dwóch prac publikowanych w *Science of the Total Environment* jako że stanowią one integralną składową pracy. Obydwie składowe otrzymałem na moją prośbę po przesłaniu pracy.

Wszystkie artykuły wchodzące w skład rozprawy są powiązane tematycznie i konsekwentnie realizują cele rozprawy nakreślone w omówieniu pracy w podziale na gatunki oraz analizowane biomarkery narażenia.

3.2. Wskazanie oraz ocena celu pracy kandydata:

Podstawowym celem pracy było zbadanie czasoprzestrzennego zróżnicowania ekspozycji na kontaminację rtęcią i ołowiem u dwóch gatunków ptaków wodnych, łabędzia niemego oraz bociana czarnego, przy użyciu dwóch biomarkerów ekspozycji - krwi oraz puchu. Kolejnym celem było ustalenie wpływu obecności badanych pierwiastków w organizmach ptaków na ich cechy morfometryczne oraz fizjologię. W pracy sformułowano również szereg celów szczegółowych dotyczących m. in. przeanalizowania poziomów badanych ksenobiotyków w zależności od płci i wieku ptaków, oraz bliskości potencjalnych źródeł emisji zanieczyszczeń, a także znalezienia podobieństw i różnic we wzorcach akumulacji rtęci i ołowiu w organizmach badanych gatunków reprezentujących różne poziomy troficzne.

Cele rozprawy sformułowane są poprawne. Większość z celów szczegółowych została faktycznie zrealizowana w pracach wchodzących w skład rozprawy. Jednak ostatni z wymienionych celów (tj. znalezienie podobieństw i różnic wzorców akumulacji rtęci i ołowiu pomiędzy przedstawicielami dwóch poziomów troficznych) nie jest zaadresowany w żadnej z opublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy (są tylko czasem odniesienia do tej

kwestii w dyskusjach niektórych prac) także nie został bezpośrednio osiągnięty (w omówieniu prac jest stosowny podrozdział na ten temat ale nie traktuję tej części jako osobnej składowej pracy równocennej z opublikowanymi artykułami). Zresztą byłoby tylko możliwe w przypadku ołowiu dla którego od obydwu gatunków pobrano ten sam typ prób (tj. krew).

W pracy nie sformułowano żadnych hipotez ani oczekiwań – myślę, że byłoby to w pełni możliwe biorąc pod uwagę informacje zawarte we wstępie do omówienia prac. Być może wtedy bardziej klarowne byłoby niektóre kwestie – np. wykorzystanie wielu różnych cech biometrycznych czy fizjologicznych w pracy.

Wprowadzenie w tematykę badawczą we wstępie do omówienia pracy jest prawidłowe. Charakteryzuje badane ksenobiotyki, drogi kontaminacji organizmów, uzasadnia wybór gatunków wykorzystanych w pracy oraz wskazuje na luki w wiedzy finalnie doprowadzając czytelników do celów pracy. Również dalej w podrozdziale Materiały i Metody znajduje się opis zgromadzonych prób oraz uzasadnienie zastosowanych metod terenowych i analitycznych.

3.3. Ocena koncepcji pracy

Poruszana tematyka, tj. ustalenie czynników mogących mieć wpływ na stopień kontaminacji organizmów żywych ksenobiotycznymi metalami ciężkimi i ich wpływem na organizm są istotnymi zagadnieniami ekotoksykologicznymi we współczesnym świecie z rosnącymi poziomami emisji i akumulacji w środowisku różnych pierwiastków i związków szkodliwych dla zdrowia i życia organizmów. W rozprawie podjęto próbę oszacowania czynników i wpływu narażenia dwóch gatunków ptaków wodnych na rtęć i ołów – pierwiastków łatwo dostępnych/akumulujących się w środowisku wodnym. Interesujący jest wybór gatunków reprezentujących różne poziomy troficzne a co za tym idzie narażonych na różne poziomy biomagnifikacji. W związku z tym można spodziewać się odmiennego stopnia ich narażenia na obydwa ksenobiotyki. Roślinożerny łąbądź niemy jest podatny na zatrucia ołowiem ze względu na omyłkowe połykanie śrucin ołowianych bądź/i ciężarków wędkarskich (zamiast naturalnych gastrolitów). Natomiast głównie rybożerny bocian czarny może być bardziej podatny na zatrucia rtęcią ze względu na jej akumulację w tkankach ryb. W pracy uwzględniono szereg czynników mogących wpływać na poziom akumulacji badanych pierwiastków. Były to oprócz kategorii wiekowo-płciowych również kwestie zróżnicowania czasowego (wewnątrz- oraz między-sezonowego) oraz przestrzennego (z uwzględnieniem różnych typów siedlisk i źródeł akumulacji). Uwzględnienie tych czynników jest bardzo istotne dla zrozumienia złożoności mechanizmów związanych z akumulacją ksenobiotycznych metali w organizmie.

Nie kwestionując niewątpliwych zalet koncepcji rozprawy należy wskazać na pewne kwestie koncepcyjno-metodologiczne, które mogłyby być inaczej zaplanowane:

- 1) nie najwłaściwszy dobór grup do analiz czasoprzestrzennych w przypadku łabędzi niemych – próby na obecność Hg i Pb we krwi pobrane zimą w zurbanizowanej strefie Krakowa stanowią jedyną próbę dla tej pory roku podczas gdy próby zebrane latem pochodzą zarówno ze stref zurbanizowanych jak i terenów wiejskich (Kucharska et al. 2019, *Environmental Pollution*, Kucharska et al. 2022 *Science of the Total Environment*). Nie można więc porównywać wartości dla zimy i lata mając niezbalansowane próby pod względem typu środowiska [tj. dane z zimy tylko dla terenów zurbanizowanych (w przypadku Hg i Pb), a dane z lata tylko z terenów niezurbanizowanych (dla Hg)]. Autorzy zresztą wspominają o tym problemie w dyskusji pracy na temat zawartości rtęci we krwi (Kucharska et al. 2019, *Environmental Pollution*).
- 2) wybór gatunków do badań. Jednym z celów pracy było porównanie ekspozycji ptaków wodnych z różnych poziomów troficznych. Wytypowanie łabędzia niemego jako konsumenta makrofitów nie budzi moich zastrzeżeń. Natomiast myślę, że lepszym gatunkiem modelowym reprezentującym rybożerców byłby jakiś obligatoryjny ichtiofag pospolitszy i łatwiej dostępny do badań, np. kormoran, a nie gniazdujący w rozproszeniu bocian czarny z bardziej zróżnicowaną i oportunistyczną dietą. Niemniej podziwiam skuteczne pozyskanie prób od bociana czarnego co musiało stanowić nie lada wyzwanie organizacyjno-logistyczne.

Na koniec wyrażę również pewien niedosyt, że nie zaplanowano pozyskania danych o poziomach rtęci i ołowiu w środowisku oraz w pokarmie badanych gatunków. Mam jednak pełną świadomość, że takie kompleksowe prace są nieczęsto realizowane ze względu na spore nakłady sił i środków. Ale tak zaplanowane prace mogą znacząco przybliżyć do zrozumienia krążenia i akumulacji ksenobiotycznych metali w środowisku.

3.4 Wskazanie oraz ocena zastosowanych metod badawczych:

Dobór metod poboru prób, prac laboratoryjnych i narzędzi statystycznych uważam za poprawne. Ponieważ wedle oświadczeń autorskich Doktorantka nie wykonywała analiz statystycznych nie będę się odnosił szczegółowo do tej kwestii. Nie będę też się odnosił do analiz chemicznych ponieważ nie czuję się do tego kompetentny.

Mam natomiast dwie uwagi odnośnie wyboru biomarkerów:

- 1) Jako biomarkery narażenia wybrano krew (na Hg i Pb u łabędzia niemego oraz Pb u bociana czarnego) obrazującą krótkotrwałą, lokalną ekspozycję, oraz puch u piskląt bociana

czarnego obrazujący ekspozycję na Hg i Pb samicy-rodzica w okresie formowania jaja. Wybór krwi jest w pełni uzasadniony (szczególnie w kontekście wiązania poziomów akumulacji w organizmie z potencjalnymi lokalnymi źródłami emisji) i jest to szeroko stosowany biomarker w podobnych badaniach. Natomiast wybór puchu piskląt może być bardziej kontrowersyjny w sytuacji występowania dwóch generacji puchu u piskląt oraz różnych strategii gromadzenia zasobów na potrzeby uformowania jaj przez samicę. W przypadku gatunków migrujących stosujących strategię *capital breeder* poziom kontaminacji materiału przekazanego przez samice-rodzica (tj. jajo, pierwszy puch pisklęcy) będzie odpowiadał zanieczyszczeniom napotkanym przez nią na trasie wiosennej migracji. Zaś przy strategii *income breeder* lokalnym zanieczyszczeniom jako że samica gromadzi lokalnie, już po przylocie na lęgowisko, zasoby niezbędne do produkcji jaj. U samicy bociana czarnego możemy mieć do czynienia ze strategią mieszaną co bardzo utrudnia interpretację geograficznej lokalizacji źródła pochodzenia badanych ksenobiotyków. Jest to dodatkowo utrudnione ze względu na występowanie u piskląt dwóch, praktycznie nieodróżnialnych przy poborze, pokoleń puchu o odmiennej genezie (ang. *protopile and mesopile down*) i źródle pochodzenia zakumulowanych pierwiastków (odpowiednio ze źródeł mieszanych poprzez transfer od samicy-rodzica i ze źródeł lokalnych poprzez bieżąco dostarczany pokarm). W tym kontekście można zastanawiać się nad trafnością wyboru puchu jako biomarkera ekspozycji szczególnie jeśli chcemy rozpoznać potencjalne źródła ksenobiotyków w środowisku. Zresztą należy zaznaczyć, że autorzy są świadomi tego problemu i sygnalizują go w dyskusji pracy o zawartości rtęci w puchu (Kucharska et al. 2021, *Environmental Pollution*). W kontekście prawdopodobnie mieszanej strategii gromadzenia zasobów na potrzeby uformowania jaj warto byłoby przeanalizować u piskląt bocianów czarnych poziom rtęci również w krwi, nie tylko w puchu.

- 2) Jako biomarkery skutków ekspozycji w organizmach badanych ptaków wybrano cechy biometryczne, masę ciała, poziom hematokrytu oraz glutationu. Generalnie jest to trafny wybór poparty przykładami innych prac stosujących te biomarkery. Moje zastrzeżenia budzi sposób wykorzystania cech biometrycznych piskląt bociana czarnego jako biomarkera efektów ekspozycji. Problem stanowi sposób w jaki ustalano wiek piskląt. Dostęp do piskląt ograniczony był do jednej kontroli w sezonie (co zrozumiałe ze względów bezpieczeństwa ptaków) a ocena wieku piskląt następowała na podstawie stosownego równania przewidującego wiek piskląt na podstawie długości skrzydła. Jeśli zawartość badanego pierwiastka wpływała niekorzystnie na tempo wzrostu kości i piór skrzydeł to wiek piskląt o opóźnionym tempie wzrostu ze względu na zbyt wysokie poziomy określonego

pierwiastka był niedoszacowany. Trafiły zatem do młodszej grupy wiekowej zamiast poprawnego zaklasyfikowania ich do przynależnej wyższej kategorii wiekowej jako osobniki dotknięte skutkami podwyższonej koncentracji badanego ksenobiotyku w organizmie.

3.5. Ocena części rozprawy doktorskiej dotyczącej omówienia wyników badań:

Generalnie wyniki we wszystkich pracach przedstawione są jasno i zrozumiale. Zostały poddane krytycznej analizie z zaznaczeniem ograniczeń interpretacyjnych i poddane dyskusji w oparciu o inne opublikowane prace.

Niektóre jednak stwierdzenia z dyskusji nie są poparte wynikami analiz – np. w pierwszej pracy (tj. Kucharska et al. 2019, *Environmental Pollution*) jeden z pierwszych wniosków (poziom rtęci we krwi łabędzi wahał się w zależności od sezonu i industrializacji) nie jest poparty żadnymi analizami statystycznymi - nie porównywano miejsc o różnym stopniu industrializacji w tym samym okresie fenologicznym. Również w przypadku pracy Kucharska et al. 2021, *Environmental Pollution* na początku dyskusji znajdujemy informację, że koncentracje rtęci w puchu piskląt bocianów czarnych różniły się istotnie pomiędzy lokalizacjami gniazdowymi. Ten wynik nie jest jednak poparty żadnymi analizami statystycznymi tylko analizą wizualną mapki z interpolacją międzypunktową stężeń (Fig. 3).

W omówieniu prac sformułowano jasne i poprawne wnioski podsumowujące wyniki z poszczególnych artykułów stanowiących rozprawę.

3.6. Ocena zastosowanego piśmiennictwa w ramach rozprawy doktorskiej:

Spisy cytowanej literatury w poszczególnych artykułach jak i w omówieniu obejmują szeroki wachlarz prac dotyczących zarówno kwestii ekotoksykologicznych jak i biologii i statusu badanych gatunków

3.7. Informacje dotyczące praktycznego zastosowania uzyskanych wyników badań:

Uzyskane dane dotyczące stwierdzonych poziomów rtęci oraz ołowiu w organizmach badanych ptaków stanowią cenne dane referencyjne, szczególnie w przypadku praktycznie nie poznanego pod tym względem bociana czarnego. Rozprawa zawiera również cenne charakterystyki biometryczne czy fizjologiczne (poziom hematokrytu, glutationu) badanych gatunków.

Informacje dotyczące poziomów ekspozycji na badane ksenobiotyki, szczególnie w przypadku biomarkerów odnoszących się do bieżących i lokalnych poziomów pierwiastków w

środowisku (krew), stanowią ważny element biomonitoringu informującego o lokalnych poziomach zanieczyszczeń kontaminacji w środowiskach wodnych gdzie żerowały obydwie badane gatunki.

3.8. Informacja o ewentualnych nieprawidłowościach, które pojawiły się w ocenianej rozprawie doktorskiej;

Oprócz kwestii wspomnianych już wcześniej przy omawianiu kolejnych punktów dodatkowo nie jestem przekonany co do trafności użycia terminu *trends* (tj. trendy) w kontekście zróżnicowania czasoprzestrzennego. To pojęcie związane jest z rozwojem, zmianą kierunkową; użycie takiego terminu byłoby uzasadnione gdyby w rozprawie wykazano wyraźnie trendy kierunkowe – np. jednoznaczny wzrost określonych wartości z wiekiem czy znalezienie gradientów przestrzennych o wyraźnych cechach (np. wzrost kontaminacji wraz z bliskością określonych typów siedlisk). Tego typu wyraźnych, statystycznie udokumentowanych trendów opartych na wielopunktowych danych ciągłych jednak w rozprawie nie odnotowano; w związku z powyższym myślę, że odpowiedniejszym terminem niż trendy byłyby po prostu wzorce (*patterns*) nie sugerujące żadnego kierunkowego trendu.

Przytoczone w niniejszej recenzji różnego rodzaju uwagi krytyczne nie mają na celu umniejszenia walorów rozprawy ani nie zmieniają faktu, że Doktorantce udało się skutecznie zrealizować główne cele postawione w pracy. Pokazują jak trudno jest zaplanować i przeprowadzić badania w warunkach terenowych, które będą uwzględniały wiele nierzadko wzajemnie ze sobą skorelowanych czynników decydujących o różnych poziomach ekspozycji organizmów i które są obarczone ryzykiem nie pozyskania zaplanowanej wielkości próby.

3.9. Ocena, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego;

Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego, Doktorantka wraz ze współautorami wypracowała oryginalną koncepcję i cele badań, wytypowała gatunki oraz opracowała metodykę zbioru i analizy danych. Cele zostały zrealizowane. Wynikiem interesującym z punktu widzenia ekotoksykologicznego na poziomie badanego obszaru było stwierdzenie, że u większości przebadanych osobników obydwu gatunków poziomy rtęci i ołowiu w krwi i puchu były niewielkie. Tylko u pojedynczych osobników notowano poziomy ołowiu przekraczające normy toksyczności przyjmowane dla ptaków wodnych. Kolejnym ciekawym wynikiem pracy było pokazanie, że łąbędzie nieme gnieźdzące się bliżej terenów zurbanizowanych miały wyższe poziomy badanych ksenobiotyków we krwi porównaniu do ptaków gnieźdzących się na terenach wiejskich.

Natomiast u piskląt bocianów czarnych lokalizacja gniazd bliżej źródeł emisji zanieczyszczeń przemysłowo skutkowała wyższym stężeniem rtęci (ale nie ołowiu) w puchu. Tego typu zależności możemy intuicyjnie się spodziewać ale często trudno znaleźć udokumentowane wyniki konkretnych analiz dla różnych grup organizmów. I wreszcie ważnym rezultatem pracy było stwierdzenie, że odnotowane poziomy ekspozycji nie powodowały obserwowalnych negatywnych skutków dla badanych ptaków – zarówno pod względem cech biometrycznych, fizjologicznych, czy behawioralnych (choć tych ostatnich akurat systematycznie nie analizowano).

3.10. Ocena, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach.

Informacje zawarte zarówno we wstępie i dyskusji wyników w omówieniu pracy jak i w we wstępach i dyskusjach do poszczególnych artykułów jasno wskazują, że Doktorantka posiadała wiedzę teoretyczną z zakresu m.in. ekotoksykologii, biologii i ekologii ptaków niezbędną do planowania i przeprowadzania badań.

3.11. Ocena, czy rozprawa doktorska prezentuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

Wedle oświadczeń autorskich wkład Doktorantki w powstanie wszystkich prac wchodzących w skład rozprawy był wiodący i dotyczył wypracowania koncepcji i metodyki badań, uczestnictwa w pracach terenowych, poborze próbek, analizach laboratoryjnych, weryfikacji danych, wizualizacji, pisaniu i poprawianiu manuskryptów prac wchodzących w skład rozprawy. Było on również wyrażony pierwszą pozycją na liście autorów oraz funkcją autorki korespondencyjnej we wszystkich pracach.

Doktorantka skutecznie zrealizowała zaplanowane badania i doprowadziła do ich opublikowania skutecznie współpracując z grupą współautorów zaangażowanych w zbiór materiału oraz analizy. Manuskrypty poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy zostały pozytywnie ocenione przez niezależne grono recenzentów i redaktorów co poskutkowało ich publikacją w renomowanych czasopismach.

Zrealizowanie wspomnianych powyżej punktów jasno wskazuje, że przedstawiona rozprawa prezentuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę.

4. Zagadnienia do dyskusji w czasie obrony

1) Jaka jest przyszłość badań ekotoksykologicznych opartych wyłącznie na poziomach stężeń toksyn w organizmach z pominięciem ich poziomów w środowisku? Czy faktycznie można w pełni zgodzić się ze stwierdzeniem ze wstępu pierwszego artykułu wchodzącego w skład rozprawy, że biomonitoring z pomocą żywych zwierząt wydaje się być bardziej wiarygodny (w odniesieniu do dostępu do fauny i flory) jako sposób oceny stężeń środowiskowych substancji niż zwykle monitorowanie ich stężeń w wodzie, powietrzu i glebie?

2) Jak należałoby najlepiej ustalić poziom tła dla badanych pierwiastków?

3) Jak zaprojektowałaby Pani swoje badania gdyby zaczynała je w tym momencie (i miała dostęp do odpowiednich funduszy na ich przeprowadzenie)?

5. Podsumowanie

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani **mgr inż. Katarzyny Kucharskiej** spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie Pani **mgr inż. Katarzyny Kucharskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Dariusz Jakubas



