

Olsztyn, 5.03.2025 r.

Dr hab. inż. Renata Augustyniak-Tunowska, prof. UWM,
Katedra Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej,
Instytut Inżynierii i Ochrony Środowiska,
Wydział Geoinżynierii,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
ul. Prawocheńskiego 1, 10-720 Olsztyn

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Agnieszki Drewek**

pt: „**Reakcje małży *Unionidae* na nowe rodzaje zanieczyszczeń wód. Potencjalne wykorzystanie małży w systemach wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniami**”

wykonanej pod kierunkiem Promotora
prof. UAM dr hab. Piotra Klimaszyka
na Wydziale Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

1. Podstawa formalna sporządzenia recenzji

Podstawą formalną sporządzenia recenzji była Uchwała nr 133/2020/2021, § 13 ust. 1 Senatu Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 28 czerwca 2021 roku dotycząca określenia sposobu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 26 maja 2023 roku przekazana pismem z dnia 8.01.2025 r., sygnowanym przez Prodziekana ds. Nauki i Współpracy Międzynarodowej Wydziału Biologii prof. dr. hab. Jakuba Kosickiego.

2. Ocena celowości podjęcia tematu

Ekosystemy wodne na całym globie są poddawane coraz większej presji ze strony człowieka. Wzrost populacji przekłada się na coraz większe zapotrzebowanie na wykorzystanie dostępnych zasobów wodnych, generuje również coraz większą liczbę zanieczyszczeń odprowadzanych do środowiska. Koncepcja granic planetarnych,

która została wprowadzona do nauki w 2009 przez Rockströma i wsp. roku jako jedną z takich granic proponuje analizę wpływu nowych substancji wytworzonych przez człowieka w laboratoriach (tzw. *novel entities*) na środowisko. Te związki chemiczne, wcześniej nie istniejące w przyrodzie np. środki ochrony roślin, plastiki, środki zmniejszające palność (PFAS), leki i ich metabolity po wykorzystaniu przez człowieka trafiają do środowiska oddziałując na biocenozy roślin i zwierząt. Często są to bardzo trwałe zanieczyszczenia ze względu na brak w środowisku naturalnych mechanizmów ich biodegradacji. Ekosystemy wodne są szczególnie narażone na niekorzystne oddziaływanie zanieczyszczeń. Do naturalnych mechanizmów samooczyszczania wód możemy zaliczyć biofiltrację, którą w ekosystemach wodnych przeprowadzają organizmy pobierające pokarm na drodze odfiltrowywania cząstek zawieszonych w wodzie. Matże są jednymi z najefektywniejszych biofiltratorów i z tego powodu pełnią bardzo ważną rolę w procesach samooczyszczania wód powierzchniowych. Liczne badania testowały możliwości biofiltratorów do usuwania zanieczyszczeń takich jak związki organiczne czy metale ciężkie z wody. Ta grupa organizmów rozwinęła wydajne mechanizmy radzenia sobie z zanieczyszczeniami i substancjami toksycznymi na poziomie fizjologicznym i biochemicznym, stąd matże uznawane są za bardzo dobre indykatory stanu środowiska. Ich reakcja na obecność zanieczyszczeń w wodzie polegająca na ograniczeniu filtracji znalazła zastosowanie między innymi w biologicznym systemie ostrzegania o zanieczyszczeniu wód powierzchniowych ujmowanych do celów komunalnych.

Ze względu na wprowadzanie przez człowieka zupełnie nowych związków chemicznych do środowiska, mogących negatywnie wpływać na biologiczne komponenty ekosystemów wodnych, badania oddziaływania tych związków na biofiltratory są bardzo ważne i otwierają potencjalne możliwości zastosowania matży również do monitoringu tego typu zanieczyszczeń. Jest to relatywnie nowy obszar badań. W tym kierunku podążyły badania przeprowadzone przez Panią mgr Drewek w jej pracy doktorskiej.

Oprócz testowania reakcji matży na nowe rodzaje zanieczyszczeń wód Doktorantka zainteresowała się również biologicznym aspektem rekultywacji jezior metodą inaktywacji fosforu przy użyciu koagulantów. Metoda ta polega wprowadzaniu wybranych związków chemicznych do wód jeziornych w celu usunięcia nadmiaru



związków fosforu z wody i jego inaktywacji w osadach dennych. Inaktywacja fosforu jest zabiegiem radykalnym, stosowanym w silnie zdegradowanych jeziorach hipertroficznym z masywnym zjawiskiem zasilania wewnętrznego. Analiza efektów zastosowania takiego zabiegu na wybrane komponenty biologiczne ekosystemów jeziornych była przedmiotem relatywnie licznych badań w literaturze, natomiast testowanie reakcji małży na wprowadzane do jezior koagulanty jest poszerzeniem wiedzy na ten temat.

3. Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska pani mgr Agnieszki Drewek została przedstawiona w formie 166-stronnicowego manuskryptu. W skład opracowania wchodzi dwa opublikowane wieloautorskie artykuły naukowe w czasopismach posiadających Impact Factor, wymienione na stronie 9 pracy:

- Drewek A., Rybak. M., Drzewiecka K., Niedzielski P., Polak J., Klimaszyk P., 2022. The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration. *Journal of Environmental Management* 318, p. 115535; **IF 8,91, MNiSW 200 pkt.**
- Drewek A., Lubawy J., Domek P., Polak J., Stocińska M., Dzięgielewska A., Klimaszyk P., 2024. Behavioral and biochemical effects of glyphosate-based herbicide Roundup on Unionid mussels: are mussels good indicators of water pollution with glyphosate-based pesticides? *Water* 16(13), p. 1882; **IF 3,0, MNiSW 100 pkt.**

W przedłożonych do oceny dwóch opublikowanych pracach Pani mgr Drewek jest pierwszym autorem.

Oprócz dwóch wymienionych publikacji (których kopie dołączono do których dołączono też oświadczenia Doktorantki oraz współautorów o wkładzie pracy w ich powstawanie) znaczną część manuskryptu zajmuje opis trzeciej serii eksperymentów badających reakcję małży na zanieczyszczenie farmaceutykami stosowanymi powszechnie w medycynie jako przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i przeciwzapalne (paracetamolem, diklofenakiem oraz ibuprofenem).

Struktura rozdziałów manuskryptu rozprawy jest następująca: streszczenie w języku polskim i angielskim (R1 i 2, s. 5-8); wykaz publikacji będący podstawą rozprawy (R3, s. 9); wstęp i cel pracy (R4, s. 10-13); metodyka badań (R5, s.14-20), wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych i paracetamolu na reakcję behawioralną małży z rodziny Unionidae (R6, 21-94); wpływ koagulantu żelazowego na behavior, stechiometrię i biochemię małży z rodziny Unionidae (R7, s. 95- 101); behawioralne i biochemiczne efekty herbicydu Roundup opartego na glifosacie na małże z rodziny Unionidae wraz z konkluzjami końcowymi dysertacji (R8, s. 102-108); bibliografia obejmująca 173 pozycje (R9, s. 109-128); publikacja 1 wraz z oświadczeniami współautorów (R 10, s. 129-144), publikacja 2 wraz z oświadczeniami współautorów (R 11, 145-166). Numeracja tabel i rysunków jest ciągła.

Hipotezy badawcze zostały postawione w każdej z trzech głównych części dysertacji (R6, 7 i 8), natomiast weryfikacja postawionych hipotez została zamieszczona na końcu każdej z tych części.

4. Szczegółowa ocena merytoryczna recenzowanej rozprawy doktorskiej

Ze względu na fakt, że w recenzowanej dysertacji są dwa opublikowane artykuły w renomowanych czasopismach, które przeszły szczegółowy proces oceny i redakcji, w mojej recenzji przedstawię ocenę tekstu manuskryptu rozprawy.

Cykl badań przedstawionych do oceny uznaje za spójny tematycznie – dotyczy on reakcji behawioralnych małży z rodziny Unionidae na obecność w wodzie różnego rodzaju związków chemicznych – wybranych farmaceutyków, wybranych soli żelaza oraz herbicydu Roundup® opartego na glifosacie.

W zwięzłym wstępie do dysertacji Doktorantka przedstawia ogólne informacje o ekosystemach wodnych, ich zanieczyszczeniu w wyniku działalności człowieka oraz charakterystykę roli małży w tych ekosystemach. Podany jest również cel główny pracy, którym była ocena reakcji małży słodkowodnych z rodzaju Unio na nowe rodzaje zanieczyszczeń docierających do ekosystemów wodnych oraz ocena wykorzystania tych małży do sygnalizowania obecności testowanych zanieczyszczeń w systemach wczesnego ostrzegania. Postawiony cel badawczy oceniam jako ważny, gdyż makrobiofiltratory wydają się być dzięki swoim rozmiarom dobrym wskaźnikiem zanieczyszczenia wód, a badania ich reakcji na obecność niedostatecznie jeszcze

przeanalizowanego oddziaływania nowych typów zanieczyszczeń, takich jak farmaceutyki lub herbicydy dostarcza cennych informacji, mogących znaleźć zastosowanie w przyszłości w analizie skutków szeroko pojętej antropopresji.

W następnym rozdziale (R5) Metodyka badań szczegółowo przedstawiono pozyskiwanie małży do testów, metodykę badań reakcji behawioralnej małży oraz analiz fizyko-chemicznych wody, składu chemicznego mięśni nogi małży, a także badań biochemicznych. Liczebność grupy badanych organizmów wynosiła $n=8$. Metody badawcze zostały dobrane zgodnie z obowiązującymi standardami w tego typu badaniach. Mam w tym miejscu pytanie, czy podczas eksperymentów małże były karmione? W tekście znajduje się jedynie informacja o karmieniu w okresie aklimatyzacji. W rozdziale tym zabrakło również ryciny wskazującej na mapie zbiorniki wodne, z których pobierano osobniki badanych małży do eksperymentów.

W rozdziale szóstym, najobszerniejszym objętościowo przedstawiono wyniki eksperymentów nad wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych i paracetamolu na reakcję behawioralną małży trzech gatunków – rodzimych *Unio tumidus* (Phillipson, 1788) i *Anodonta anatina* (L.) oraz inwazyjnego – *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834). Dla każdego z testowanych gatunków zbadano reakcję behawioralną. Eksperyment prowadzony był w temperaturze 16 °C i natlenieniu powyżej 90%. Czas trwania eksperymentu wynosił 48 h. Natomiast dla najwyższych stężeń obserwacje behawioru prowadzono przez 5 dni. Testowane hipotezy badawcze były następujące:

- H1: Narażenie małży na badane farmaceutyki będzie skutkowało ograniczeniem ich aktywności filtracyjnej. Redukcja aktywności będzie występowała już przy narażeniu na niewielkie stężenia leków, a intensywność reakcji będzie się zwiększała wraz ze wzrostem koncentracji leków.
- H2: Reakcja małży na stężenia farmaceutyków odnotowywane w środowisku będzie wystarczająco intensywna, by mogły być one zastosowane do detekcji zanieczyszczenia wód farmaceutykami w ramach systemów wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem.
- H3: Redukcja aktywności filtracyjnej inwazyjnego gatunku *Sinanodonta woodiana* w reakcji na zanieczyszczenie wód badanymi farmaceutykami będzie mniej intensywna w porównaniu z rodzimymi gatunkami małży skójkowatych.

Każdy z badanych farmaceutyków był testowany w trzech różnych stężeniach - a każde z kolejnych testowanych stężeń było dziesięciokrotnie wyższe od poprzedniego (paracetamol 0,3-- 3-30 µg/l; diklofenak 1-10-100 µg/l, ibuprofen 1-10-100 µg/l).

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że wszystkie badane gatunki małży reagowały na obecność farmaceutyków w wodzie zmniejszeniem aktywności filtracyjnej, lecz istotne statystycznie wyniki uzyskano dla wyższych stężeń testowanych substancji. Nie zaobserwowano jednak gwałtownej reakcji małży na obecność testowanych farmaceutyków, co wyklucza przydatność tych bioindykatorów do systemów wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem wody tymi substancjami. Natomiast za szczególnie ważne uważam pozytywne zweryfikowanie przez Doktorantkę trzeciej hipotezy badawczej – że inwazyjny gatunek *Sinanodonta woodiana* reaguje na zanieczyszczenie farmaceutykami mniej intensywnie (mniejsze ograniczenie filtracji), niż obydwa rodzime gatunki skójkowatych, co może potwierdzać wyższą tolerancję szczepu chińskiej na zanieczyszczenie, zwiększając jej konkurencyjność w stosunku do małży rodzimych w wypadku obecności w wodach zanieczyszczonych.

Mam jeszcze komentarz edytorski do tej części pracy – w nagłówkach tabel należałoby umieścić jednostki. Również na stronie 29 (R 6.4.1.2) umieszczone jest niepoprawne stężenie PCM – powinno być 3 µg L⁻¹.

W kolejnym rozdziale 7 recenzowanej dysertacji pani mgr Drewek analizuje wpływ koagulantu żelazowego – FeCl₃ na behavior, stechiometrię chemiczną i biochemię małży z rodziny Unionidae. Badania miały zweryfikować następujące hipotezy badawcze:

H1: koagulant żelazowy (FeCl₃) stosowany w rekultywacji zbiorników wodnych będzie zaburzał aktywność filtracyjną małży *Unio tumidus* i *Anodonta cygnea*. Stopień redukcji aktywności filtracyjnej małży będzie zależny od dawek stosowanego koagulantu.

H2: Koagulant żelazowy będzie wywoływał stres oksydacyjny w komórkach małży narażonych na jego działanie.

H3: Narażenie małży na koagulant żelazowy będzie wywoływało zaburzenia stechiometrii chemicznej ciał małży.

Testowane dawki koagulantu wynosiły od 2 do 20 g Fe m⁻². Doświadczenie prowadzono w zlewkach o poj. 1 L, w których umieszczano osobniki małży. Temperatura wody wynosiła 18 °C. Podczas doświadczenia analizowano parametry fizyko-chemiczne wody, jak również po zakończeniu eksperymentu wykonano analizy fizyko-chemiczne ciała małży pod kątem zmian zawartości wybranych pierwiastków jak też oznaczono markery stresu oksydacyjnego.

Uzyskane wyniki badań wykazały, że zastosowanie chlorku żelazowego jako koagulantu może wpływać negatywnie na behavior małży obydwu testowanych gatunków (ograniczenie aktywności filtracyjnej), zaburzać stechiometrię chemiczną ciała (kumulację żelaza w mięśniach oraz spadek zawartości wapnia i fosforu), natomiast narażenie małży na koagulant żelazowy nie powoduje istotnych symptomów stresu oksydacyjnego.

Pozwolę sobie w tym miejscu na komentarz z punktu widzenia praktyka zajmującego się rekultywacją jezior. Wyniki tych eksperymentów uświadamiają o potencjalnie negatywnych skutkach zastosowania koagulantu żelazowego w ekstremalnie wysokich stężeniach. W praktyce rekultywacyjnej metodę inaktywacji fosforu stosuje się w jeziorach hypertroficznym, z dużą zawartością związków fosforu w wodzie i bardzo nasilonym zjawiskiem zasilania wewnętrznego. Metoda ta ma na celu eliminację fosforu z wody i jego strącenie oraz zablokowanie w osadach dennym. Można ją stosować przy odpowiednich parametrach fizyko-chemicznych wody (odpowiednie właściwości buforowe). Nie powinno się jej stosować przy wysokich temperaturach wody, w okresie wegetacyjnym, przy wysokiej aktywności hydrobiontów. Ponadto zaplanowaną ogólną ilość koagulantu dzieli się na mniejsze dawki zapewniające bezpieczeństwo ekologiczne rekultywowanego zbiornika wodnego. Prawidłowo prowadzony monitoring odpowiednich parametrów fizyko-chemicznych wody *in situ* podczas aplikacji dodatkowo zabezpiecza przed wystąpieniem negatywnych skutków takich zabiegów. Zatem w praktyce niebezpieczeństwo narażenia hydrobiontów na tak wysokie dawki preparatów chemicznych, powodujących tak drastyczne zmiany warunków środowiskowych jak te opisane w publikacji, przy zabiegach prowadzonych zgodnie ze sztuką jest w mojej opinii mało prawdopodobne, chyba że rekultywacja jest prowadzona przez wykonawców nie posiadających podstawowej wiedzy teoretycznej i praktycznej,

koniecznej przy stosowaniu tej metody w skali technicznej. Tych informacji, lub rekomendacji dla potencjalnych praktyków rekultywacji jezior zabrakło mi w dyskusji wyników i wnioskach przeprowadzonego eksperymentu. I też tu mam pytanie do Doktorantki – czy przy planowaniu dawek koagulantów do eksperymentu odnoszono się do pojedynczych dawek aplikacyjnych stosowanych w rekultywacji jezior tą metodą, czy też wzięto pod uwagę całościowe dawki konieczne do inaktywacji, które przy rozbiciu na kilka aplikacji byłyby niższe?

W kolejnym rozdziale dysertacji (R8) przedstawiono wyniki badań nad wpływem herbicydu Roundup® opartego na glifosacie na matkę z rodziny Unionidae. Problemy środowiskowe związane z zastosowaniem *novel entities* są cały czas badane na świecie. Stąd problem badawczy podjęty przez doktorantkę wpisuje się w ten trend badawczy. Niestety herbicydy oparte na glifosacie, zawierające w swoim składzie surfaktanty, są stosowane do zwalczania chwastów w uprawach i mogą migrować do ekosystemów wodnych. Notuje się również użycie tego typu preparatów bezpośrednio w zbiornikach wodnych do zwalczania niepożądanych makrofity. Stąd biofiltratory mogą być bezpośrednio narażone na ich negatywne działanie.

Doktorantka w tych badaniach weryfikowała następujące hipotezy:

H1: Narażenie matki na RDP będzie powodowało ograniczenie ich aktywności filtracyjnej. Redukcja aktywności będzie występowała już przy narażeniu na niewielkie stężenie herbicydu, a intensywność reakcji unikania zwiększy się wraz ze wzrostem koncentracji RDP.

H2: Reakcja matki na stężenia RDP odpowiadające koncentracji odnotowywanej w środowisku będzie wystarczająco intensywna, by mogły być one zastosowane do detekcji zanieczyszczenia wód RDP w ramach systemów wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem.

H3: Narażenie matki na RDP będzie wywoływało stres oksydacyjny w ich komórkach.

Testowane stężenia herbicydu wynosiły 15, 150 i 1500 µg GLY/l. Pozostałe parametry eksperymentu (temperatura, natlenienie, czas trwania) były podobne jak w poprzednich doświadczeniach.

Doktorantka w tym eksperymencie wykazała, że obecność herbicydu opartego na glifosacie w wodzie powoduje istotną statystycznie reakcję matki polegającą na



ograniczeniu filtracji, tym wyraźniejszą, im większe stężenie preparatu było obecne w badanej wodzie. Obserwowana reakcja była jednak za słaba, żeby można było wykorzystać badane gatunki *Unionidae* w systemach wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem. Nie odnotowano również istotnych statystycznie różnic w poziomie markerów stresu oksydacyjnego pomiędzy grupą kontrolną małży, a grupami badanymi. Moje pytanie w do tego rozdziału jest następujące: czy w przeprowadzonym eksperymencie obserwowana reakcja małży mogła być nasiloną ze względu na obecność surfaktantu w składzie preparatu? Czy istnieje możliwość oddzielenia reakcji na sam glifosat od reakcji na złożony preparat zawierający glifosat i surfaktant?

Na końcu rozdziału 8 (R8) znajduje się paragraf zatytułowany „Konkluzje końcowe dysertacji”, w którym Pani mgr Drewek dokonuje zwięzłego podsumowania wszystkich badań, zawartych w ramach dysertacji doktorskiej. Uważam, że ten paragraf powinien być wyszczególniony w tekście jako kolejny rozdział, gdyż rozdział 8 ogólnie jest poświęcony tylko części dysertacji, dotyczącej wpływu herbicydu Roundup® na małże. Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie testowane substancje (farmaceutyki, koagulant żelazowy, oraz herbicyd Roundup® oparty na glifosacie) mogą powodować ograniczenie aktywności filtracyjnej małży, wpływać na ich fizjologię oraz stechiometrię ciała (w przypadku koagulantu żelazowego). Doktorantka stwierdza również, że przy występującym chronicznym narażeniu małży na testowane substancje, nawet przy niewielkich stężeniach, nie są wykluczone negatywne skutki działania tych substancji w dłuższym okresie na populację małży. Pani mgr Drewek wskazuje również na konieczną kontynuację badań w tym zakresie i poszerzenie wiedzy na temat oddziaływania tego typu substancji na młodociane stadia małży.

Wiele badań w literaturze potwierdza wyższe tempo filtracji u młodych osobników, jak również większą akumulację związków szkodliwych. Młodociane stadia małży nie mają jeszcze dobrze wykształconych mechanizmów ochronnych przed toksynami, dlatego występujące w środowisku zanieczyszczenia mogą oddziaływać na nie bardziej intensywnie. Zgadzam się tu z Doktorantką, że badania tego typu powinny być kontynuowane.

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedłożona mi do oceny dysertacja doktorska Pani mgr Agnieszki Drewek pt: „Reakcje małży *Unionidae* na nowe rodzaje

zanieczyszczeń wód. Potencjalne wykorzystanie małży w systemach wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniami” stanowi znaczące i oryginalne osiągnięcie Autorki oraz wnosi do dyscypliny nauk biologicznych elementy poznawcze, a także aplikacyjne. Uzyskane w niniejszych badaniach wyniki poszerzają wiedzę w zakresie oddziaływania zanieczyszczeń zaliczanych do *novel entities* na biofiltratory. Również wnioski z eksperymentu nad oddziaływaniem koagulantów żelazowych na małże powinny być brane pod uwagę przez praktyków zajmujących się rekultywacją jezior.

Wskazane w recenzji uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną badań przeprowadzonych przez Panią mgr Agnieszkę Drewek. Zakres przeprowadzonych badań oceniam wysoko, także na podkreślenie zasługuje bardzo umiejętne skonstruowanie stanowiska badawczego, pozwalającego na precyzyjne pomiary otwarcia muszli. Doktorantka wykazała się umiejętnością prawidłowego formułowania hipotez badawczych i ich weryfikacji, odpowiednim doбором metod analitycznych, jak również oraz prawidłowej interpretacji wyników. W związku z powyższym rozprawę doktorską Pani mgr Agnieszki Drewek **opiniuję pozytywnie.**

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Drewek spełnia wymagania wynikające z art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dn. 20.07.2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024, poz. 1571).

Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Drewek do dalszych etapów postępowania kwalifikacyjnego o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Renata Augustyniak-Twarda