Zakład Chemii i Biochemii Morza
INSTYTUT OCEANOLOGII
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ul. Powstańców Warszawy 55,
81-712 Sopot

tel. (48 58) 7311939

Prof. dr hab. Ksenia Pazdro

Sopot, 25.09.2023

RECENZJA
rozprawy doktorskiej pani mgr Kariny Bodziach
pt. „Uptake, Accumulation and Elimination of Endocrine Disrupting Phenolic Compounds in Selected Waterbirds from the Southern Baltic"
(w j. polskim "Wnikanie, kumulacja i eliminacja endokrynnie aktywnych pochodnych fenolu u wybranych ptaków wodnych z rejonu południowego Bałtyku")

wykonanej w Katedrze Oceanografii Chemicznej i Geologii Morza Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. inż. Marty Staniszewskiej, prof. UG oraz dr Igi Nehring .

Recenzja rozprawy doktorskiej została wykonana na wniosek Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego, prof. dr hab. Wojciecha Tylmanna (pismo O002/1333/2023 z dnia 11.07.2023)

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w nurt poznania cykli biogeochemicznych pierwiastków i związków szkodliwych, co jest niezbędne do możliwie dokładnego poznania stanu zanieczyszczenia środowiska przyrodniczego tymi substancjami oraz oszacowania wynikających stąd konsekwencji dla środowiska, w szczególności bytujących tam organizmów oraz dla zdrowia człowieka. Pochodne fenolu: bisfenol A (BPA) oraz alkilofenole 4-tert-oktylofenol (4-t-OP) i 4-nonylofenol (4-NP) były szeroko stosowane w przemyśle chemicznym do produkcji różnych produktów, w tym tworzyw sztucznych, żywności, opakowań i innych wyrobów. Jednak ze względu na obawy dotyczące potencjalnych skutków zdrowotnych tych substancji, w szczególności działanie endokrynne, wiele krajów wprowadziło ograniczenia w stosowaniu tych związków. Przykładowo, wiele krajów zakazało lub ograniczyło stosowanie BPA w produktach dla dzieci i opakowaniach żywności. Działania te mają na celu zmniejszenie narażenia przede wszystkim ludzi na te substancje chemiczne. Pomimo wycofania lub znacznego ograniczenia stosowania środków zawierających pochodne fenolu, zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego tymi związkami wciąż jest problemem, szczególnie ze względu na ich potencjalne oddziaływanie endokrynne. Dotyczy to również ekosystemów morskich, szczególnie przybrzeżnych, które są końcowym odbiornikiem zanieczyszczeń pochodzących z lądu. Wcześniejsze badania prowadzone w zespole, w którym Doktorantka realizowała swoja rozprawę wskazują na obecność pochodnych fenolu w abiotycznych składowych ekosystemu Zatoki

Gdańskiej, jak również w organizmach z niższych poziomów troficznych oraz w rybach. W badaniach przepływu pochodnych fenolu pomiędzy różnymi komponentami ekosystemu Zatoki Gdańskiej ptaki do tej pory nie były uwzględniane. Podobnie jest w przypadku innych akwenów morskich. Natomiast w przypadku trwałych zanieczyszczeń i metali ciężkich stwierdzono, że ptaki wodne nadają się do monitorowania zanieczyszczeń środowiska, z racji ich pozycji w łańcuchu pokarmowym, długowieczności i mobilności, dzięki czemu „integrują" zanieczyszczenia na dużym obszarze. W przeciwieństwie do metali ciężkich czy trwałych zanieczyszczeń organicznych, bardzo rzadko możemy znaleźć dane dotyczące narażenia ptaków wodnych na pochodne fenolu, a w szczególności rozmieszczenia tych związków w poszczególnych tkankach i organach. Nie bez znaczenia jest fakt, że w przypadku organizmów z wyższych poziomów troficznych, szczególnie kręgowców, przebieg procesów pobierania, eliminacji i ich wyniku czyli kumulacji zanieczyszczeń jest dużo bardziej złożony niż w przypadku organizmów z niższych poziomów troficznych, a miarodajna ocena tych procesów wymaga pracochłonnych badań oraz współpracy ze specjalistami z innych dziedzin.

W tym świetle program badawczy realizowany przez Doktorantkę, którego wyniki zawarto w rozprawie pt „Uptake, Accumulation and Elimination of Endocrine Disrupting Phenolic Compounds in Selected Waterbirds from the Southern Baltic" należy uznać za wypełniający lukę poznawczą w badaniach dotyczących obiegu endokrynnie czynnych pochodnych fenolu w morskich ekosystemach przybrzeżnych.

Dysertacja została napisana w języku angielskim i liczy ponad 100 stron. Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi spójny zbiór składający się z 3 artykułów opublikowanych w latach 2021-2022 w renomowanym multidyscyplinarnym czasopiśmie z obszaru nauk przyrodniczych „Science of the Total Environment" o wysokim współczynniku wpływu (IF_{2022}=9,8, 200 pkt. wg punktacji Ministerstwa Edukacji i Nauki) oraz manuskryptu złożonego w redakcji tego samego czasopisma. Mgr Karina Bodziach we wszystkich pracach jest pierwszym autorem. Wszystkie prace mają charakter wieloautorski, co wynika z interdyscyplinarnego charakteru przedstawionej mi do recenzji rozprawy. Załączone do rozprawy oświadczenia współautorów oraz oświadczenia w samych artykułach (*credit authorship contribution statement*) jednoznacznie wskazują na znaczący wkład doktorantki w opracowanie koncepcji badań, wykonanie analiz, opracowanie danych, interpretację wyników, a przede wszystkim przygotowanie wszystkich manuskryptów. Cykl publikacji poprzedzony jest obszernym 18 stronicowym streszczeniem w języku polskim oraz 11 stronicowym streszczeniem w języku angielskim. Te zwięzłe i starannie przygotowane opracowania zawierające wprowadzenie do zagadnień poruszanych w rozprawie, cel i zakres prac, wnioski wynikające z badań przedstawionych w załączonych publikacjach bez wątpienia przekonują, ze rozprawa stanowi zwartą całość a jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie

problemu naukowego. Rozprawa zakończona jest spisem ponad 50 aktualnych pozycji literaturowych wykorzystanych w przygotowaniu streszczeń. Streszczenia świadczą również o bardzo dobrej wiedzy teoretycznej Doktorantki w zakresie przedstawianej tematyki badań, a przedstawiony zakres prac badawczych pozwala stwierdzić, że doktorantka podeszła do realizacji celów rozprawy w sposób rzetelny i kompleksowy. Jako anality Doktorantka wybrała dwa alkilofenole o podobnej lipofilności (4-tert-oktylofenol i 4-nonylofenol (4-NP) oraz mniej lipofilny, ale powszechnie występujący w środowisku bisfenol A. Istotnym elementem, który wpłynął na ciekawą dyskusję, było to że doktorantka wybrała do badań gatunek, dla którego Bałtyk jest stałym miejscem bytowania (alka pospolita) oraz dwa inne – lodówkę i nurogęś, które przebywają na Bałtyku jedynie w okresie pozalęgowym. Ponadto badane gatunki różnią się między sobą dietą. Dogłębna analiza dostępnych danych literaturowych pozwoliła Doktorantce wykazać zasadność planowanych badań, sformułować założenia rozprawy jak również postawić 5 hipotez badawczych:

1. Alki, lodówki i nurogęsi bytujące w rejonie południowego Bałtyku charakteryzują się zróżnicowanym narażeniem na bisfenol A i alkilofenole
2. Inhalacja stanowi istotną drogę narażenia alki, lodówki i nurogęsi na BPA, 4-*t*-OP i 4-NP.
3. Narządy strategiczne dla prawidłowego rozwoju ptaków, w tym mózg, gonady, nerki i wątroby, stanowią główne miejsce kumulacji endokrynnie aktywnych pochodnych fenolu
4. Pióra i pazury alki oraz lodówki stanowią istotną drogę eliminacji pochodnych fenolu z ich organizmów
5. Jelita, płuca i pióra alki, lodówki i nurogęsi są dobrymi wskaźnikami zanieczyszczenia środowiska

do weryfikacji których zaproponowała 4 cele badawcze przyporządkowując je jednocześnie poszczególnym publikacjom.

Sposób weryfikacji hipotez nie budzi wątpliwości. Cel naukowy rozprawy został poprawnie i logicznie sprecyzowany. Prace eksperymentalne zostały przez Doktorantkę prawidłowo zaplanowane oraz wykonane w staranny sposób stosując odpowiednie metody analityczne, co pozwoliło na realizację założonych zadań. Nie mam wątpliwości, że zbiór wyników uzyskanych przez doktorantkę stanowi bardzo rzetelną podstawę do wnioskowania i został umiejętnie wykorzystany w publikacjach, szczególnie w ich części dyskusja. Przeprowadzane badania pozwoliły Doktorantce na zrealizowanie założonych celów pracy i weryfikację postawionych przez doktorantkę hipotez. Doktorantka pozytywnie zweryfikowała 4 hipotezy, natomiast hipoteza 5 została zweryfikowana pozytywnie tylko częściowo, gdyż badania nie potwierdziły

użyteczności analizowanych wytworów naskórka jako bezinwazyjnego narzędzia badania narażenia ptaków wodnych na pochodne fenolu.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki przedstawione w rozprawie, stanowiące jednocześnie element nowości naukowej uważam:

- zbadanie dróg narażenia ptaków na pochodne fenolu (droga pokarmowa vs oddechowa), wykazanie zróżnicowania między gatunkami ptaków i analitami oraz rejonem badań, a w szczególności wykazanie znaczenia drogi oddechowej jako istotnej drogi narażenia ptaków na 4-tert-oktyfenol w sezonie zimowym
- rozpoznanie rozmieszczenia badanych analitów wewnątrz organizmów ptaków pomiędzy poszczególne tkanki i narządy, w tym wykazanie, że endokrynnie aktywne pochodne fenolu w znacznym stopniu kumulują się w narządach strategicznych dla funkcjonowania takich jak mózg, wątroba, nerki czy gonady,
- wieloaspektową interpretację rozmieszczenia pochodnych fenoli w organizmach badanych ptaków uwzględniającą właściwości fizykochemiczne badanych związków, sposób odżywiania, poziom troficzny ptaków, jak również stan zanieczyszczenia siedlisk
- wykazanie (po raz pierwszy w przypadku ptaków wodnych) obecności BPA i alkilofenoli w gonadach lodówki z Zatoki Gdańskiej jak również wykazanie wpływu wieku i płci na wielkość zmierzonych stężeń w gonadach tych endokrynnie czynnych związków

Uzyskane wyniki są również istotne z punktu widzenia wyjaśnienia obserwowanego zmniejszania się populacji ptaków wodnych na Bałtyku i niewątpliwie mogą stanowić istotny przyczynek do wyjaśnienia tego zjawiska.

W trakcie lektury rozprawy nasunęło mi się kilka uwag i komentarzy, które przedstawiam poniżej. Publikacja 3 artykułów stanowiących podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej w czasopiśmie „Science of the Total Environment" oznacza, że ich treść została pozytywnie oceniona już przez kompetentnych recenzentów. Publikacja w czasopiśmie STOTEN oraz cytowanie prac wskazuje jednoznacznie, że podjęta problematyka, postawione pytania naukowe, zakres prac i sposób ich realizacji zostały przez środowisko naukowe ocenione jako wartościowe naukowo, a prace są już cytowane przez innych autorów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że badaniom został poddany obszerny materiał badawczy a dyskusja zawarta w artykułach jest bardzo wnikliwa. Zaten moje uwagi czy komentarze mają charakter dyskusyjny lub są natury edytorskiej.

Rozszerzone streszczenie zawiera podsumowanie wyników badań, natomiast zabrakło mi skrótowego opisu wyników. Przedstawienie najważniejszych wyników w kontekście założonych

hipotez i celów badawczych uzasadniałoby w bardziej przejrzysty sposób wnioski, które zostały zawarte w podrozdziale podsumowanie i przyczyniłoby się do uzyskania bardziej spójnego obrazu rozprawy. Z kolei wydaje mi się, w pierwszej części streszczenia- uzasadnieniu badań zbędne było odniesienie do treści poszczególnych artykułów wchodzących w skład rozprawy. Do postawionych hipotez autorka powinna była odnieść się w podsumowaniu, jak to zresztą zrobiła. Przyszłe kierunki badań zostały jasno przedstawione w poszczególnych artykułach w ramach konkluzji, natomiast zabrakło mi trochę tego wątku w streszczeniu.

Badania prowadzono na ptakach poławianych zimą. Czy autorka rozprawy spodziewa się podobnych wniosków, gdyby uwzględnić sezonowość np. w przypadku alki. Dodam ze pytanie jest spowodowane ciekawością recenzenta czy też zachętą do przyszłych badań, ponieważ materiał zaprezentowany w pracy i tak jest ogromny, więc trudno oczekiwać żeby i ten aspekt był uwzględniony w ramach tej jednej rozprawy, ale ciekawa jestem zdania doktorantki.

W interpretacji wyników doktorantka posługuje się wartościami mediany, co oczywiście jest słusznym podejściem w analizie statystycznej różnic międzygatunkowych czy różnic w stężeniu pochodnych fenoli w poszczególnych tkankach i narządach i pozwoliło na weryfikację hipotez. W publikacjach nie doszukałam się natomiast komentarza co do różnic w stężeniach w danym narządzie czy tkance między pojedynczymi osobnikami tego samego gatunku, a w większości przypadków zakres wartości stężeń był szeroki i mieścił od wartości granicy oznaczalności (a nawet poniżej) do kilkuset ng/g s.m. Poprosiłabym doktorantkę o komentarz.

Czy w przyszłych badaniach nie warto by uwzględnić analiz ilościowych a nawet jakościowych lipidów i białek w tkankach i narządach, być może dodatkowo pomogłoby to w interpretacji wyników dotyczących rozmieszczenia pochodnych fenolu w tkankach i narządach. Ponadto wykonanie prostego oznaczenia całkowitej zawartości lipidów w próbkach pozwoliłoby na obliczenie współczynników akumulacji biorąc pod uwagę stężenia w przeliczeniu na masę lipidów. To podejście jest często stosowane prze innych autorów, zatem potencjalnie ułatwiłoby porównanie wartości współczynników kumulacji dla pochodnych fenoli z tymi obliczonymi dla innych zanieczyszczeń/gatunków.

Bardzo interesujący jest wątek różnic w kumulacji/rozmieszczeniu miedzy organami alkilofenoli (4-t-OP i 4-NP), które charakteryzują się zbliżoną lipofilnoscią, czy doktorantka mogłaby krotko podsumować to zagadnienie wskazując na główne czynniki jakie zidentyfikowała w pracy, a także jakie jeszcze należałoby uwzględnić w przyszłych badaniach.

Czy doktorantka mogłaby krótko scharakteryzować określenie „wolna frakcja 4-t-OP we krwi" oraz opisać procedurę analityczną oznaczania wolnej frakcji 4-t-OP we krwi w tym różnice w izolacji frakcji wolnej i całkowitej, ciekawa jestem dlaczego w badaniach nie uwzględniono całkowitej zawartości pochodnych fenolu we krwi podczas gdy dane literaturowe wymienione w

publikacji 2 wskazują na znaczenie zawartości fosfolipidów i triglicerydów w krwi w procesach kumulacji zanieczyszczeń chloroorganicznych w organizmach delfinów (Kawai i wsp. 1998).

W publikacji 1 doktorantka interpretując dane odnośnie wyższych stężeń pochodnych fenolu w jelitach lodówki poławianej na Zatoce Pomorskiej w porównaniu do lodówki z Zatoki Gdańskiej stwierdza, że te wyniki są zgodne z raportami GIOŚ o stanie chemicznym wód Zatoki Pomorskiej i Zatoki Gdańskiej (zły vs dobry), czy stwierdzenie to w przypadku Zatoki Pomorskiej wynikało z dostępu do danych rzeczywistych stężeń pochodnych fenoli w wodach Zatoki Pomorskiej zamieszczonych w tych raportach czy oszacowano, że narażenie jest wysokie na podstawie stężeń innych związków szkodliwych? Nie jest to do końca jasne.

Z praktycznego punktu widzenia, nie do końca zgodziłabym się z hipotezą 5 i sugestią zawartą w konkluzjach pierwszego artykułu, o przydatności analiz pochodnych fenoli w płucach i jelitach ptaków jako wskaźniku zanieczyszczenia środowiska abiotycznego (powietrza i wody), oczywiście można ją pozytywnie zweryfikować biorąc pod uwagę przedstawione przez doktorantkę wyniki, jednak z punktu widzenia logistycznego (pozyskanie materiału i procedury analityczne) pomiary w składowych abiotycznych lub przy użyciu próbników pasywnych wydają się mniej skomplikowane.

Z recenzenckiego obowiązku wymienię poniżej kilka nielicznych drobnych niedociągnięć, które zauważyłam:

- w streszczeniu (str. 8 i kolejne) doktorantka określa jako tkanki: jelita, płuca, mięśnie, nerki, wątroby, mózgi, tłuszcz podskórny, gonady, tymczasem znacząca część z wymienionych to narządy

- w streszczeniu str. 12 doktorantka podaje, że badania prowadzono na martwych ptakach pozyskanych z przyłowu w latach 2015-2016, tymczasem z publikacji wynika, że próbki pobierano w latach 2014-2016

W streszczeniu str.17, „biomagnifikacja u bentofagów" to raczej skrót myślowy bo zjawisko dotyczy łańcucha troficznego lub jego części.

W publikacji 2 w materiałach i metodach przy wzorach dotyczących obliczania współczynnika biomagnifikacji brakuje wyjaśnienia: stężenia w której tkance/narządzie ptaków zostały wzięte pod uwagę w obliczeniach oraz czy stężenia w diecie ptaków dotyczą organizmów bentosowych pobranych w tym samym czasie co ptaki?

W manuskrypcie publikacji 4 w konkluzjach użyto sformułowania „Seabirds and especially long-tailed ducks, are under a lot of stress today..." chyba to skrót myślowy bo nie wydaje mi się żeby akurat to lodówka była szczególnie narażona na stres

Podsumowanie

Wymienione wyżej nieliczne uwagi czy też komentarze nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej i walorów poznawczych przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej. Doktorantka uzyskała nowatorskie wyniki, które zostały zaprezentowane w renomowanym czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania - Science of the Total Environment. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera bardzo obszerny materiał doświadczalny, a Doktorantka wykazała się dużą wnikliwością w opracowaniu tak dużego zbioru uzyskanych danych, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki oceniam jako istotny wkład w poszerzenie wiedzy o obiegu endokrynnie aktywnych pochodnych fenolu w środowisku morskim. Jej treść niewątpliwie przyczyni się do lepszego zrozumienia obiegu tych związków w środowisku morskim, a w szczególności może stanowić przyczynek do wyjaśnienia zmniejszania się populacji ptaków na Bałtyku

Reasumując, po zapoznaniu się z całością pracy jestem w pełni przekonana, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa pani mgr Kariny Bodziach odpowiada ustawowo określonym warunkom stawianym rozprawom doktorskim. Wnioskuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie ocenianej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie pani mgr Kariny Bodziach do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na obszerny zakres prac, biegłość poruszania się Doktorantki w przedstawionej tematyce, wysoki poziom merytoryczny rozprawy, w szczególności w części dyskusja, oraz opublikowanie wyników badań w renomowanym czasopiśmie o szerokim zasięgu międzynarodowym wnioskuję do Wysokiej Rady o rozważenie wyróżnienia przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej.