

Łódź, 15 V 2016 r.

dr hab. Michał Grabowski, prof. UŁ
Zakład Biogeografii i Ekologii Bezkręgowców
Katedra Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Opinia

o rozprawie doktorskiej mgr Moniki Wiśniewskiej

pod tytułem:

**Wpływ 17 α -etynyloestradiolu (EE2) na przeżywalność, zachowania rozrodcze
i różnicowanie płci gatunku *Gammarus tigrinus* Sexton, 1939**

Zanieczyszczenie środowiska i jego konsekwencje dla ekosystemów naturalnych oraz dla człowieka to problem, który od co najmniej pół wieku nurtuje zarówno badaczy, lekarzy, decydentów jak i opinię publiczną. Toksyczne efekty działania wielu substancji, zarówno nieorganicznych jak i organicznych, poznano i opisano już dość dawno i szczegółowo. Stosunkowo słabo poznano jednak jeszcze rolę zanieczyszczeń dla funkcjonowania biocenoz oraz witalności (zdolności reprodukcyjnych, dyspersji) populacji poszczególnych gatunków. Jest to szczególnie istotne w przypadku gatunków określanych jako „zwornikowe” (keystone species), które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania całego ekosystemu i warunkują istnienie wielu innych gatunków. Od co najmniej dwudziestu lat wiadomo, że pewne grupy substancji allochtonicznych w środowisku powodują zaburzenie gospodarki hormonalnej organizmów, zakłócając funkcjonowanie zarówno gruczołów dokrewnych jak i regulowanych przez nie procesów fizjologicznych i ontogenetycznych. Do substancji takich należą np. syntetyczne hormony płciowe z grupy ksenoestrogenów, a wśród nich np. 17 α -etynyloestradiol (EE2) - składnik większości współczesnych, dwuskładnikowych środków antykoncepcyjnych. Związek ten spotykany jest przede wszystkim w środowisku wodnym, gdzie wpływa nie tylko na zwierzęta żyjące w tym środowisku ale także na lądowe, które wodę piją.

Do tej pory w literaturze światowej opublikowano ponad 1000 artykułów dotyczących działania EE2 na organizmy żywe. Około 40 prac na ten temat pojawiło się tylko w ciągu kilku miesięcy jakie minęły od początku 2016 r. Można więc uznać, że temat ten został już dogłębnie przestudiowany. Warto jednak zwrócić uwagę, że prace te w ogromnej większości dotyczyły człowieka i stosunkowo niewielu organizmów modelowych – przede wszystkim ssaków, płazów i ryb. Znacznie mniej badań koncentrowało się na organizmach bezkręgowych, a szczególnie na skorupiakach obunogich z rodziny Gammaridae. Jest to zaskakujące o tyle, że skorupiaki te odgrywają bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów wodnych (często są uważane za gatunki zwornikowe) a w ostatnich dekadach są popularnymi organizmami modelowymi w testach ekotoksykologicznych.

W swojej rozprawie doktorskiej mgr Wiśniewska postawiła sobie dwa główne cele. Pierwszym było opisanie dynamiki populacji euryhalinowego gatunku kielża *Gammarus tigrinus* w słonawych wodach Zatoki Puckiej. W Europie jest to obcy gatunek o pochodzeniu północnoamerykańskim. Obecnie stanowi on główny komponent zespołów organizmów bentosowych w litoralu bałtyckich lagun przybrzeżnych. Drugim celem było zbadanie toksyczności 17 α -etynyloestradiolu dla *G. tigrinus*, poprzez określenie jego toksyczności ostrej oraz wpływu na przeżywalność, zachowania rozrodcze oraz proporcję płci u badanego gatunku kielża.

Nie bardzo rozumiem potrzeby realizacji pierwszego z nich. Cykl życiowy *G. tigrinus* w Europie został już dobrze poznany i opisany w literaturze, dotyczy to również populacji w Zatoce Puckiej badanej m.in. przez prof. Szaniawską, promotorkę mgr Wiśniewskiej. Wyniki tej części pracy nie wnoszą zatem niczego nowego do nauki a więc, moim zdaniem, badania te nie były w ogóle potrzebne. W dodatku nie mają one w zasadzie żadnego związku z eksperymentami w dalszej części pracy, których wyniki moim zdaniem w zupełności wystarczyłyby jako materiał na rozprawę doktorską. Zawarcie obu celów w rozprawie, sprawia to że traci ona na spójności. Widać to zwłaszcza w Dyskusji, gdzie wyniki badań terenowych i eksperymentów są dyskutowane zupełnie rozłącznie. Moim zdaniem znacznie większy sens miałyby prosta ocena proporcji płci w populacji dzikiej, na podstawie reprezentatywnej próby

z powtórzeniami, w okresie gdy prowadzone były analogiczne eksperymenty. Mniej roboty a umożliwiłoby to porównanie tego parametru (jako dodatkowej kontroli) z wynikami uzyskanymi w laboratorium. Pomijając brak celowości badań nad dynamiką populacji *G. tigrinus* w terenie, zostały one przeprowadzone raczej poprawnie. Niejasny jest dla mnie sposób w jaki mierzono zebrane osobniki. Podano jedynie informację, że wielkość ciała mierzono od podstawy czułek do końca telsonu pomijając kwestię zwijania się (w różnym stopniu) osobników podczas konserwacji w etanolu. Powoduje to, że pomiary długości ciała obarczone będą znacznym błędem jeśli do mierzenia nie rozprostuje się każdego osobnika, np. przy linijce. Moim zdaniem określanie mokrej masy kielży również obarczone jest dużym błędem ze względu na ogólnie duże oszczecinienie odnóży co sprzyja zachowaniu sporej ilości wody między nimi. Stopień oszczecinienia jest różny w zależności od płci, sezonu oraz stadium reprodukcyjnego. Wobec tego nie byłbym przekonany, że błąd ten jest taki sam w przypadku pomiaru każdego osobnika. Efektem takich błędów mogą być np. olbrzymie odchylenia standardowe od średnich wartości współczynnika Fultona widoczne na rysunku 13 (str. 40). Muszę przyznać, że przy takich odchyleniach dziwią mnie bardzo statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami współczynnika dla samców i samic we wszystkich analizowanych miesiącach. Przy okazji, dziwi mnie że nie porównano przy pomocy odpowiednich metod statystycznych wartości tego wskaźnika pomiędzy miesiącami. Dotyczy to również proporcji płci oraz udziału w populacji samic rozradzających się i osobników młodocianych w poszczególnych miesiącach. Opis oraz interpretacja wyników zostały w tym przypadku przeprowadzone poprawnie ale na poziomie podstawowym. Trudno się jednak zgodzić ze stwierdzeniami typu „Duża liczba osobników juwenilnych, znacznie przewyższająca liczebność samic z jaj których się wykluły, świadczy o wysokiej płodności oraz o dużym sukcesie rozrodczym osobników rodzicielskich. (str. 44)”. Istotnie, składnikiem strategii reprodukcyjnej u *G. tigrinus* jest względnie wysoka płodność, ale nie jest ona miarą sukcesu rozrodczego, którego wartość określa się w stosunku do średniej w populacji (a w dodatku na podstawie liczby osobników potomnych, które osiągnęły dorosłość i przekazują geny rodziców kolejnemu pokoleniu) – polecam tutaj doktorantce zapoznanie się z dowolnym podręcznikiem ekologii ewolucyjnej. Wniosek, że temperatura jest czynnikiem, który w dużym stopniu

wpływa na cykl rozrodczy kielży jest zasadniczo poprawny ale nie można pomijać roli długości dnia, której zmiany są tu również bardzo ważnym czynnikiem opisanym w literaturze (np. Steele i Steele 1970, Steele 1977, Fish i Preece 1979, Hughes 1978, Moore 1981, Grabowski I in. 2014). W interpretacji względnej liczebności osobników młodocianych zabrakło odniesienia do zjawiska kanibalizmu oraz „intraguild predation”, które są ważnymi czynnikami wpływającymi na strukturę wiekową populacji obunogów z rodziny Gammaridae. Przy okazji, nie wiem co miała na myśli doktorantka pisząc, że „*G. tigrinus* charakteryzuje się specyficznymi zachowaniami rozrodczymi”. Zachowania tego gatunku są akurat dość typowe dla wszystkich kielży. Literatura dotycząca biologii i ekologii rozrodu obunogów jest bardzo bogata, podczas gdy doktorantka ograniczyła się jedynie do przejrzania i zacytowania najbardziej podstawowych pozycji, w dodatku dotyczących głównie badanego gatunku.

Znacznie wyżej oceniam drugą część pracy, dotyczącą wpływu EE2 na *G. tigrinus* ale muszę przyznać, że ekotoksykologia nie jest domeną moich badań. Doceniam obszerny wstęp przybliżający laikowi budowę i zastosowania EE2 jak również jego rolę w środowisku, wpływ na organizmy żywe i metody jego oznaczania. Zaciekało mnie, dlaczego w podrozdziale Wstępu pt. „Zawartość EE2 w środowisku” autorka podaje tylko ogólne dane dotyczące poziomu EE2 w rzekach Polski z jednej pracy sprzed 12 lat (Dudziak i Luks-Betlej 2004). Czy poziom EE2 w wodach nie jest standardowo oznaczany w naszym kraju. Szkoda, że brak takich informacji w pracy. Przy okazji – czy wiadomo jaki jest czas naturalnej biodegradacji EE2 w zbiornikach wodnych w naszej strefie klimatycznej?

Część eksperymentalna pracy została zaplanowana prawidłowo, w sposób typowy dla analogicznych eksperymentów ekotoksykologicznych opisywanych w literaturze przedmiotu. Zastanawiają mnie jedynie szczegóły. Na przykład na str. 31 doktorantka pisze „W badaniu pilotażowym wykorzystano 20 par kielży, czyli 40 osobników o podobnej wielkości.”. Warto przy tym pamiętać, że u kielży z reguły samce są znacząco większe od samic (co ma związek z ich systemem kojarzenia). Autorka zresztą sama stwierdza ten fakt w dalszej części pracy. Jak oceniano czy osobniki miały podobną czy różną wielkość ciała przy ich doborze do eksperymentu? Z tekstu wynika, że ocena wielkości ciała miała miejsce już po eksperymencie,

a osobniki dość mocno różniły się pod tym względem. Istnieją przecież metody pozwalające na przybliżone i nieinwazyjne oszacowanie wielkości ciała u obunogów. Niepokoi mnie również dość skrótowy rozdział dotyczący statystycznego opracowania uzyskanych wyników. W badaniach eksperymentalnych dobór odpowiednich metod analiz statystycznych jest kluczowy dla wyciągnięcia poprawnych i wiarygodnych wniosków. Moim zdaniem metody statystyczne użyte do analizy wyników z poszczególnych założeń eksperymentalnych powinny zostać opisane bardziej szczegółowo w rozdziałach dotyczących tych eksperymentów. Ułatwiłoby to usystematyzowanie i klarowne przedstawienie przeprowadzonych analiz i wnioskowania samej doktorantce a czytelnikowi – ich zrozumienie. Obecnie w opisie wyników znajdujemy testy, o których doktorantka nie wspomina w rozdziale dotyczącym statystycznego opracowania uzyskanych wyników (np. test analiz przeżycia Chi-kwadrat na str. 47 i 50, ANOVA Friedmana na str. 58, test t-Studenta na str. 68). Nieścisłości w interpretacji wyników pojawiają się w Dyskusji. Na przykład, porównując uzyskane przez siebie wyniki z tą samą pracą (Jaser i in. 2003), doktorantka stwierdza na str. 75, że *Ceratodaphnia reticulata* i *Sida cristallina* są bardziej wrażliwe na EE2 niż *G. tigrinus* a na kolejnej stronie (str. 76), że są one bardziej odporne na EE2 niż *G. tigrinus*. Szkoda, że brak w dyskusji próby wyjaśnienia większej liczby samic w potomstwie osobników eksponowanych na EE2 – czy jest to efekt feminizacji embrionów, czy też wyższej śmiertelności osobników męskich na wczesnych etapach ontogenezy.

Rozdział Wnioski to w istocie podsumowanie najważniejszych wyników pracy. Brakuje mi tutaj trochę konkluzji będących wynikiem przemyśleń doktorantki po konfrontacji wyników jej badań z obszerną literaturą przedmiotu.

W pracy zwraca też uwagę pewna niedbałość i nieporadność terminologiczna (np. notoryczne używanie terminu ilość zamiast liczba, zróżnicowanie płci zamiast proporcja płci, części gębowe zamiast narządy gębowe) oraz różne mniej lub bardziej humorystyczne literówki (np. *Daphnia manga* zamiast *D. magna* czy glonchidia zamiast glochidia).

Wszystkie te uwagi krytyczne dotyczą jednak głównie drobiazgów i nie zmieniają faktu, że przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską uważam za oryginalną i wartościową pracę naukową, uzyskane wyniki za wiarygodne a ich interpretację za z gruntu właściwą.

Ponieważ oceniana przeze mnie rozprawa spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim, stawiam wniosek do Rady Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Moniki Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony przedstawionych tez.



Michał Grabowski