



dr hab. Jacek Urbaniak, prof. nadzw.

Wrocław, dn. 23.01.2019

Katedra Botaniki i Ekologii Roślin

pl. Grunwaldzki 24a

50-363 Wrocław

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr **Michała Rybaka** pt. "**Respose of *Chara hispida* L. to restoration treatements using iron and aluminium coagulants**"
wykonanej w Zakładzie Ochrony Wód na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr. hab. Tomasza Joniaka.

1. Podstawa formalna sporządzenia recenzji

Recenzję rozprawy doktorskiej mgr Michała Rybaka wykonano na zlecenie Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu prof. dr hab. Przemysława Wojtaszka (pismo z dn. 30.11.2018 r.).

Kryteria oceny były zgodne z § 6 ust. 4 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2018 poz. 261) i zgodnie z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U 2018, poz. 1669), na podstawie w art. 13 ust. 1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017, poz. 1789).

2. Zasadność podjętej tematyki badawczej

W obliczu wciąż rosnącej antropopresji na środowisko naturalne, zbiorniki wodne w coraz to większym stopniu narażone są na negatywne efekty działalności człowieka. Natura, jak się wydaje często stoi na słabszej pozycji, nie tylko wskutek wyjątkowo destrukcyjnej pomysłowości człowieka co do jej niszczenia ale też propagacji swych niszczyielskich zamiarów. Elementem wprost z tego wnijkającym jest. m. in. postępująca eutrofizacja wód powierzchniowych, która na przestrzeni przeszło półwiecza urosła do rangi problemu globalnego. Wyraz temu daje choćby uchwalona w związku z pogarszającymi się warunkami środowiska wodnego przez Parlament Europejski i Radę Unii Europejskiej Dyrektywa 2000/60WE ustanawiającą ramy



współnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej, zwana potocznie Ramową Dyrektywą Wodną.

Obecnie, zachowanie odpowiedniej czystości wód wymaga nierzadko zastosowania wysoce specjalistycznych technologii, podjęcia działań wstrzymujących postępowanie eutrofizacji jak i stosownych działań naprawczych. Do takich działań należą metody rekultywacji mechanicznej, rekultywacja biologiczna czy będąca przedmiotem zainteresowania Doktoranta rekultywacja chemiczna stosująca inaktywację fosforu wykorzystującą koagulanty na bazie żelaza lub glinu. Rekultywacja chemiczna jest jedną z częściej stosowanych metod wspomagających procesy odnowy ekosystemów, jednak wprowadzanie koagulantów do środowiska może mieć również powodować negatywne efekty biologiczne wynikające z ich właściwości, których nie da się przewidzieć. Nieumiejętne i w nie właściwym okresie zastosowanie metod rekultywacji może przyczynić się do większych negatywnych zmian w ekosystemie aniżeli zaistniałe przed ich zastosowaniem, na które miały być remedium.

W związku z tym, wykonane przez Doktoranta badania, wydają się być w tej kwestii w pełni uzasadnione i dobrze wpisują się w analizę wpływu zabiegów rekultywacyjnych, a w tym na reakcje podwodnych fitocenozy łąk ramieniowych.

3. Ocena formalna pracy

Przedłożona do oceny rozprawa stanowi spójny tematycznie zestaw 4 oryginalnych prac eksperymentalnych, opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, których sumaryczny IF wynosi 8,11.

1. **Rybak M., Joniak T., Sobczyński T. 2018. Experimental Investigation into Disturbance of Ca-Mg Equilibrium and Consequences for Charophytes after Iron and Aluminium Coagulants Application.** Polish Journal of Environmental Studies 28(4): 1-9. doi:10.15244/pjoes/90095. IF 2017: 1,12
2. **Rybak M., Joniak T., Gąbka M., Sobczyński T. 2017. The inhibition of growth and oospores production in Chara hispida L. as an effect of iron sulphate addition: Conclusions for the use of iron coagulants in lake restoration.** Ecological Engineering 105: 1-6. doi: 10.1016/j.ecoleng.2017.04.044 IF 2017: 3,02
3. **Rybak M., Joniak T. 2018. Changes in Chara hispida L. morphology in response to phosphate aluminium coagulant application.** Limnological Review, 18(1), 31-37. doi: 10.2478/limre-2018-0004
4. **Rybak M., Kołodziejczyk A., Joniak T., Ratajczak I., Gąbka M. 2017. Bioaccumulation and toxicity studies of macroalgae (Charophyceae) treated with aluminium: Experimental studies in the context of lake restoration.** Ecotoxicol Environ Saf. Nov;145:359-366. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.07.056. IF 2017: 3,97

We wszystkich pracach, Pan mgr Michał Rybak jest pierwszym autorem, a jego całkowity udział wynosi odpowiednio 70%, 70%, 80% i 70%. Pozycja pierwszego autora i jak i załączone oświadczenia pozostałych współautorów nie budzą wątpliwości co wiodącej roli Doktoranta w wykonaniu badań, opracowaniu wyników jak i przygotowaniu wymienionych publikacji. W każdej z nich jest autorem koncepcji i weryfikowanych hipotez badawczych; brał udział w przeprowadzeniu eksperymentów,



pomiarach ramienic, wykonaniu analiz statystycznych, wykonaniu większości analiz chemicznych jak również przygotowaniu wersji pierwszych i ostatecznych manuskryptów, oraz ich zgłoszeniu do publikacji. Uzupełnieniem wymienionych wyżej publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej - jest zamieszczone na wstępie streszczenie napisane w j. polskim oraz w j. angielskim, a także wstęp, cel pracy i hipotezy badawcze, obiekt badań i metodyka, wyniki i ich dyskusja w kontekście najnowszych danych literaturowych oraz na końcu podsumowanie całości wraz ze stosowną literaturą. Całość przygotowana została w sposób staranny, zwarty i napisana klarownym językiem.

4. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wszystkie prace wchodzące w skład dysertacji zostały poddane ocenie przez recenzentów i edytorów czasopism naukowych, w których zostały opublikowane. Poniżej przytaczam kilka dodatkowych uwag merytorycznych odnoszących się do przedłożonej dysertacji.

Jak wynika z przedstawionej rozprawy, celem naukowym wykonanych przez Doktoranta badań było określenie mechanizmów reakcji *Chara hispida* L. na zabiegi rekultywacyjne z wykorzystaniem koagulantów fosforanowych opartych na bazie żelaza i glinu. Wybrany do badań gatunek jest jednym z kilku gatunków makroskopowych glonów - ramienic zasiedlających strefy przybrzeżne litoralu jak i wypłylenia eutroficznych zbiorników wodnych. Wymienione we wstępie cele pracy i hipotezy badawcze pozycjonują całość wykonanych badań, choć jak się wydaje częściowo się ze sobą pokrywają i z powodzeniem można było pozostawić jedynie nieco poszerzone i rozbudowane hipotezy badawcze unikając tym samym nie potrzebnych powtórzeń.

Wyniki testowania zaprezentowanej przez Doktoranta hipotezy (H1), odnoszącej się do zmian właściwości abiotycznych wód w sposób zakłócający funkcjonowanie ramienic, zostały przedstawione w dwóch pierwszych artykułach. "Experimental Investigation into Disturbance of Ca-Mg Equilibrium and Consequences for Charophytes after Iron and Aluminium Coagulants Application" oraz "The inhibition of growth and oospores production in *Chara hispida* L. as an effect of iron sulphate addition: Conclusions for the use of iron coagulants in lake restoration". Hipotezę zweryfikowano na podstawie wykonanych doświadczeń *in situ* w naturalnym stanowisku występowania ramienic oraz doświadczeń laboratoryjnych.

W wyniku zastosowania w eksperymentach koagulantów: żelazowego i glinowego, zaobserwowano obniżenie wartości pH, co doprowadziło do zmian w preferowanych przez ramienice alkalicznych warunkach środowiska uwalniając tym samym jony Ca^{2+} oraz Mg^{2+} z węglanowej inkrustacji ramienic. Podobnie, oprócz jonów Ca^{2+} istotny statystycznie był także obserwowany wzrost stężenia jonów siarczanowych (SO_4^{2-}) po aplikacji koagulantu żelazowego, a stwierdzony wzorzec zmian może



sugerować przekroczenie iloczynu rozpuszczalności siarczanu wapnia. Wskazuje to, że procesy te związane z aplikacją obu koagulantów były przyczyną zakłócenia równowagi wapniowo-magnezowej, co może skutkować zakłóceniem kalcyfikacji, a tym samym mieć wpływ na metabolizm i rozwój ramienic.

Jak wynika z przedstawionych wyników badań, analizę wody w eksperymentach przeprowadzano siedmiokrotnie, ale nie jest to do końca zbieżne z zaprezentowanymi wynikami. Odpowiednia ich prezentacja, jak w przypadku pomiarów zmian pH ma swoją wartość, gdyż pozwala na dokładniejsze prześledzenie zachodzących zmian. Brakuje wykresów analiz zmian zawartości badanych jonów, a zamiast tego widnieje zestaw rysunków podpisany jako „Zróżnicowanie koncentracji jonów pomiędzy koagulantem żelazowym i glinowym”. Owszem, prezentuje on różnice w koncentracji jonów jako procent kontroli przy zastosowaniu trzech dawek, trudno jednak dociec, czy chodzi o porównanie zawartości jonów na koniec eksperymentów, czy też są to wyniki sumarycznych wahań w przedziale czasowym trwania doświadczeń? Wyniki zawarte w Tabeli 1 także można by doprecyzować wskazując dokładniej co i jak było analizowane. Statystyka ma bowiem swoje prawa ale też i możliwości, czego jak widać Doktorant jest świadom.

Kolejna hipoteza (H2), odnosiła się do zahamowania wzrostu oraz rozmnażania ramienic, a wyniki weryfikujące ją przedstawione są przez autora w dwóch artykułach pt. "The inhibition of growth and oospores production in *C. hispida* L. as an effect of iron sulphate addition: Conclusions for the use of iron coagulants in lake restoration" oraz "Changes in *Chara hispida* L. morphology in response to phosphate aluminium coagulant application ". Jednak w obu publikacjach przedstawione wyniki doświadczeń laboratoryjnych odnoszą się nie tylko do "wzrostu" rozumianego zresztą w dysertacji przez Doktoranta jako "długość całkowita ramienic" oraz "rozmnażania", które Doktorant definiuje jako „obserwacja liczby oospor”. Otóż, precyzując przedstawione wyniki dotyczą raczej zmian w liczbie oospor oraz zmian w morfologii plechy *C. hispida* (a nie tylko zmian wzorca wzrostu) przejawiającej się m. in. długością całkowitą badanej nibyłodygi ramienic, pozostałymi mierzonymi cechami i wskaźnikiem RGR. Mankamentem jest różnorodność zastosowanych określeń mierzonych cech jaka widnieje w obu artykułach. Brakuje także graficznego przedstawienia pokroju *C. hispida* z wyjaśnieniem, które dokładnie cechy były mierzone. Czasem bowiem widnieje inna nomenklatura w tabelach, a inna w tekście co w efekcie powoduje trudność zrozumienia, które cechy były analizowane.

Jednak zasadniczym efektem uzyskanych przez Doktoranta wyników odnoszących się do wspomnianej hipotezy jest stwierdzenie występowania pod wpływem koagulantu żelazowego i glinowego zmian warunków abiotycznych środowiska oraz wynikających z tego wpływu na zmiany w morfologii *C. hispida*. Zmiany właściwości fizyko-chemicznych wody następowały właściwie już z chwilą aplikacji koagulantów. Dotyczyło to zarówno pH, jak i mętności oraz koloru wody w



przypadku zastosowania koagulantu żelazowego będącymi prawdopodobną przyczyną zmian morfologicznych. Odnotowane zostało także istotne zróżnicowanie statystyczne stwierdzone w przypadku kilku cech porównywanych w doświadczeniach o zróżnicowanej dawce siarczanu żelaza, jak i współczynnika relatywnego tempa wzrostu oraz liczby oospor. W wyniku eksperymentu, koagulant żelazowy wyeliminował zupełnie z doświadczenia z najniższą dawką fosforanów. Niestety brak podobnych wyników danych dot. zawartości fosforanów w wodzie dla pozostałych doświadczeń z różnymi dawkami. Wydaje się to być niedopatrzaniem edytorskim, zważywszy na fakt wykonywanych analiz fosforu co uwidacznia metodyka artykułu. Można oczywiście założyć, że takie z natury mają działanie koagulanty, jednak konieczność dodania stosownych inf. wynika z opisaną w artykule metodyki.

W przypadku koagulantu glinowego, obserwowano wg. autora istotne statystycznie zmiany długości odgałęzień, choć nazewnictwo mierzonych i analizowanych cech jak wspomniano powyżej jest również nieprecyzyjne, a i zaprezentowane ryciny z wynikami niezbyt czytelne. Odnotowane bowiem zostały zmiany jak się wydaje w przypadku długości komórek drugiego i trzeciego międzywęźla. Można się domyślać – bo autor tego nie precyzuje – że chodzi o oś główną *C. hispida*, czyli nibyłodygę, co jednak nie przełożyło się na ogólny wzrost długości (wysokości) *C. hispida*, która zmniejszyła się po zastosowaniu wszystkich trzech rodzajów dawek. Brak tu również grafiki porządkującej, które cechy morfologiczne były mierzone, a całość wymaga wyjaśnienia. Zauważalny jest także brak analiz fizykochemicznych wody, poza początkowymi i końcowymi badaniami zawartości fosforu, które wypadają by okrasić jakimś szerszym komentarzem. Takie właściwości jak barwa wody czy mętność były by cennym uzupełnieniem wyników badań.

Faktem jest, że zaobserwowane przez Doktoranta reakcje ramienic po aplikacji koagulantów polegające na zwiększaniu powierzchni asymilacyjnej poprzez rozwój odgałęzień bocznych, a nie wzrost osi głównej – nibyłodygi oraz wydłużenie międzywęźli należą do dotychczas nie stwierdzanych i nie potwierdzonych eksperymentalnie odpowiedzi obronnych *C. hispida* na ograniczenie dostępności światła pod wpływem zastosowania koagulantów żelazowego i glinowego. Zauważalny był także znaczny i potwierdzony statystycznie ubytek ilości oospor w przypadku zastosowania koagulantu żelazowego. Ważnym dodatkiem było by tutaj wyjaśnienie, w jakiej kondycji ramienice dotrwały do końca eksperymentu, zarówno w doświadczeniach laboratoryjnych z siarczanem żelaza, jak i *in situ* z polichlorkiem glinu, szczególnie przy zastosowaniu najwyższych dawek koagulantów oraz jakie w związku z tym wnioski płyną z finalnego efektu obu eksperymentów odnośnie praktycznego ich zastosowania i wpływu na fitocenozy ramienic.

Ostatnia, trzecia hipoteza (H3), dotycząca wywoływania uszkodzeń plech ramienic przez glin i jego aktywnej bioakumulacji została przez Doktoranta zweryfikowana w ostatnim zaprezentowanym artykule prezentującym eksperymenty *in*



situ „Bioaccumulation and toxicity studies of macroalgae (Charophyceae) treated with aluminium: Experimental studies in the context of lake restoration”. Wzrost toksyczności glinu następuje bowiem wraz ze wzrastającym zakwaszeniem wody, co jest charakterystycznym elementem zastosowania polichlorku glinu. Obserwowane symptomy toksyczności wzrastały wraz z upływem czasu ekspozycji *C. hispida* na koagulant i były zróżnicowane w zależności od zastosowanej dawki. Jednak po trzech dobach od rozpoczęcia eksperymentu widoczna była duża skala opisywanych uszkodzeń we wszystkich doświadczeniach niezależnie od zastosowanej dawki. Obserwowane było m. in. zwiótnienie plechy *C. hispida*, odpadanie komórek okorowania i redukcja chloroplastów, czyli znaczne uszkodzenia. Widocznemu zmniejszeniu ulegała także długość nibyliści ramienic. Ważnym aspektem wynikającym z niniejszej części rozprawy jest również potwierdzenie z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego alokacji glinu do wnętrza komórek, co sugeruje aktywny transport do wnętrza ramienic i gromadzenie glinu w komórkach w ilości około 2 mg/g suchej masy.

W opublikowanym artykule, w którym wyniki potwierdzają postawioną hipotezę o wywoływaniu przez glin uszkodzeń plech ramienic i jego aktywnej akumulacji brak jest określenia kondycji *C. hispida* pod koniec doświadczeń. Można również zapytać w jakim stopniu obserwowane zmiany indukowane przez stosowane dawki koagulantu glinowego mogły wpłynąć na zmiany cech morfologicznych, ich rozmiary oraz płynące z wyników analiz statystycznych wnioski analizowane w artykule trzecim pt. "Changes in *Chara hispida* L. morphology in...".

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej należy wykazanie, że:

- stosowanie chemicznych metod rekultywacji ma wpływ na rozwój i funkcjonowanie zbiorowisk *C. hispida* i każdorazowo powinno być poprzedzone stosownymi badaniami pozwalającymi na określenie bezpiecznych dawek koagulantów
- obniżenie pH wody jest podstawowym czynnikiem indukującym negatywne zmiany podczas aplikacji koagulantów, m.in. zaburza równowagę wapniowo-magnezową i indukuje toksyczność glinu, który jest odpowiedzialny za szereg uszkodzeń *C. hispida*
- powodowana przez koagulanty zmiana warunków abiotycznych może powodować zmianę rodzaju wzrostu oraz zarówno zakłócenie przebiegu rozmnażania generatywnego jak i wegetatywnego
- efekt osiągnięcia z jednej strony pozytywnych wyników rekultywacji zbiornika wodnego, może zostać zniweczony poprzez negatywny wpływ na inne organizmy, w tym na zbiorowiska ramienic.



5. Wniosek końcowy

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska Pana mgr Michała Rybaka stanowiąca spójny tematycznie zbiór oryginalnych artykułów i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę oraz umiejętności Doktoranta do samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Stwierdzam także, że Pan mgr Michał Rybak spełnia kryteria określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017, poz. 1789) dla kandydatów ubiegających się o nadanie stopień naukowego doktora i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii UAM o dopuszczenie Pana mgr Michała Rybaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Jacek Urbanicki

Wrocław, dn. 23.01.2019