

prof. dr hab. Piotr Zieliński

20.12.2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Szkudlarka pt. „Zanieczyszczenia mikroplastikiem płazów (Amphibia) w Polsce Zachodniej”**

Oceniana rozprawa została przygotowana w ramach Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego pod kierunkiem dr hab. Bartłomieja Najbara.

Rozprawa liczy 122 strony i jest odrębną monografią autorstwa mgr Michała Szkudlarka. W rozprawie wykorzystano wyniki, które częściowo zostały już opublikowane w następujących publikacjach:

*Michał Szkudlarek, Bartłomiej Najbar, Łukasz Jankowiak 2023. Microplastics pollution in larvae of toads, frogs and newts in anthropopressure gradient. Ecological Indicators, Volume 155, 110971.*

*Michał Szkudlarek, Bartłomiej Najbar and Łukasz Jankowiak 2024. Similarity of Microplastic Characteristics between Amphibian Larvae and Their Aquatic Environment, Animals, 14(5), 717.*

Zgodnie z załączonym oświadczeniem mgr Michała Szkudlarka jego udział w powstaniu powyższych dwóch publikacji stanowił 70%. Oświadczenie to jest zgodne z załączonymi oświadczeniami pozostałych współautorów powyższych publikacji. Udział doktoranta w powstaniu tych publikacji należy uznać za dominujący. Częściowe wykorzystanie tych publikacji w rozprawie doktorskiej nie budzi moich zastrzeżeń.

Celem rozprawy doktorskiej było zbadania stopnia zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów i ich środowiska. Aby te cele zrealizować doktorant wysunął 7 szczegółowych hipotez badawczych dotyczących stopnia obciążenia

mikroplastikiem różnych gatunków i różnych grup ekologicznych larw płazów oraz powiązań między liczbą i właściwościami cząstek mikroplastiku a cechami larw i zajmowanych przez nie siedlisk.

Materiał do badań będących podstawą ocenianej rozprawy zbierano od marca do września w latach 2021 – 2023 na 23 stanowiskach zlokalizowanych na obszarze woj. lubuskiego w okolicy Zielonej Góry, Sulechowa, Żar i Gorzowa Wielkopolskiego. Na stanowiskach tych zebrano z wyschniętych niewielkich zbiorników wodnych łącznie 934 martwe larwy płazów należących do 10 taksonów. Ponadto na stanowiskach tych zebrano próby wody oraz osadu dennego. Zebrane larwy płazów mierzono i ważono. Cząstki mikroplastiku izolowano z przewodów pokarmowych larw płazów, wody i osadów dennych. Następnie cząstki mikroplastiku identyfikowano, liczono, mierzono i kategoryzowano do jednego z typów morfologicznych i kolorystycznych.

Analiza przestrzenna stanowisk poboru prób polegała na wyznaczeniu wokół każdego stanowiska buforu o promieniu 1 km i obliczeniu przy pomocy systemu GIS udziału terenów zurbanizowanych i udziału terenów rolnych.

W analizie statystycznej wielkości larw wykorzystano utworzoną przy pomocy analizy głównych składowych (PCA) nową zmienną *rozmiar*, która była wysoce skorelowana z masą i długością larw. Dokonana przy pomocy współczynnika inflacji wariacji (VIF) analiza współliniowości niezależnych zmiennych ciągłych takich jak: rozmiar larwy, dzień poboru próby oraz udział terenów rolnych i zurbanizowanych w obrębie bufora wykazała brak współliniowości, w związku z czym zmienne te wykorzystano w dalszej analizie. W celu zbadania wpływu zmiennych ciągłych i kategorycznych na obciążenie mikroplastikiem larw płazów zastosowano mieszane modele regresji z ujemnym rozkładem dwumianowym. Modele mieszane zastosowano również do analizy wpływu rangi taksonomicznej, rozmiaru larw, obciążenia mikroplastikiem larw, kształtu drobin i udziału terenów zurbanizowanych na długość i pole powierzchni drobin mikroplastiku.

Zróżnicowanie typów morfologicznych mikroplastiku dla larw, w których stwierdzono obecność przynajmniej jednej drobinie analizowano z wykorzystaniem wskaźnika Levina.

Częstość występowania kształtów mikroplastików dla poszczególnych gatunków, kolorów mikroplastików dla ich poszczególnych kształtów, kolorów mikroplastików dla poszczególnych gatunków, polimerów dla poszczególnych

gatunków, oraz częstości innych substancji dla poszczególnych gatunków badano stosując analizę ANOSIN.

Do analizy podobieństwa kształtu, koloru i składu mikroplastików wyizolowanych z larw płazów zastosowano wielowzorcową analizę *Indicator Species Analysis*. Natomiast w obrębie stanowisk do analizy podobieństw koloru, kształtu oraz składu chemicznego drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z wody, osadu i larw płazów zastosowano test chi-kwadrat.

Najważniejsze wyniki otrzymane przez doktoranta to:

- mikroplastik wykryto w 73% larw płazów, co wskazuje na wagę problemu zanieczyszczenia mikroplastikiem środowiska i zamieszkujących to środowisko płazów;
- najczęściej stwierdzaną drobiną mikroplastiku było polietylenowe włókno w kolorze niebieskim;
- stopień obciążenia mikroplastikiem larw płazów był różny u różnych gatunków;
- stopień obciążenia mikroplastikiem był największy na stanowiskach o nasilonej antropopresji;
- drapieżne larwy płazów były w mniejszym stopniu obciążone mikroplastikiem w porównaniu w larwami wszystkożernymi;
- mikroplastiki wyizolowane na tych samych stanowiskach z larw płazów i wody wykazywały wyraźne podobieństwo pod względem kształtu i kolorów drobin.

#### Ocena pracy

Treść rozprawy doktorskiej jest zasadniczo zgodna z jej tytułem. Wydaję mi się jednak, że zgodność byłaby jeszcze lepsza gdyby tytuł zawężono do:

*Zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów (Amphibia) w Polsce Zachodniej*, gdyż przedmiotem badania były larwy płazów, a wiadomo, że po przeobrażeniu płazy generalnie zmieniają środowisko z wodnego na lądowe i stają się drapieżnikami, zatem nie wiadomo w jakim stopniu formy dorosłe będą obciążone mikroplastikiem.

Hipotezy badawcze zostały trafnie postawione, a otrzymane wyniki pozwoliły na ich zweryfikowanie.

Opracowanie statystyczne zebranego materiału było złożone z uwagi na różnorodność analizowanych problemów i związane z tym trudności w doborze właściwych metod statystycznych. Sposób statystycznego opracowania materiału należy uznać za bardzo wnikliwy i właściwy. W wielu przypadkach zastosowano

rzadko stosowane rozwiązania statystyczne, co wynikało właśnie z nietypowości problemów do rozwiązania. Większość tych problemów udało się rozwiązać dzięki zastosowaniu modeli mieszanych. Widzę jednak jeden problem, który wynika nie z samej metody opracowania statystycznego materiału, ale z metody zbierania materiału. Mianowicie sposób zbierania materiału, który polegał na zbieraniu wyschniętych larw płazów nie do końca jest losowym poborem próby. Jak pisze sam doktorant na stronie 20 część larw mogła ukończyć metamorfozę przed wyschnięciem zbiornika. Zatem jakaś część osobników (nie wiadomo jak duża była to frakcja) mogła już opuścić zbiornik wodny. Zebrana próba zawężyła nam się w takim razie do późniejszych kohort. I w tym sensie osobniki z późniejszych kohort są do siebie bardziej podobne i przez to nie są od siebie niezależne ze statystycznego punktu widzenia. Natomiast osobniki z wcześniejszych kohort mogły zachowywać się inaczej (pod względem obciążenia mikroplastikiem), ale tego nie wiemy, gdyż osobniki te zapewne wcześniej opuściły zbiornik wodny. W zależności od tego jak duża część larw mogła wcześniej opuścić zbiornik problem niezależności obiektów badań (osobników) może być zupełnie marginalny lub istotny w sytuacji gdyby zebrane larwy pochodziły jedynie od osobników dorosłych późno przystępujących do rozrodu.

Otrzymane wyniki okazały się bardzo interesujące i ważne z poznawczego punktu widzenia. Wyniki w pełni wynikają zebranych danych i ich bardzo dobrego statystycznego opracowania.

Inne uwagi do pracy

Str. 1 - drugie zdanie o płazach ze streszczenia: „*Kontrolują one liczebność owadów, stanowiąc jednocześnie bioindykatory stanu środowiska naturalnego*” w swojej początkowej części jest błędne i w sumie niepotrzebne. Generalnie w wielopoziomowych układach ekologicznych najczęściej liczebność gatunków poziomu niższego limituje liczebność gatunków poziomu wyższego, a nie odwrotnie. Można tutaj przytoczyć opisane przez Charlisa Eltona wahania liczebności zająca amerykańskiego i rysia kanadyjskiego. Liczebność zająca amerykańskiego limituje liczebność rysia kanadyjskiego, natomiast liczebność rysia kanadyjskiego nie limituje liczebności zająca amerykańskiego. Płazy, uogólniając, nie są tutaj wyjątkiem.

Str. 9 - drugie zdanie podsumowania brzmi: *Niniejsze studium dowodzi powszechności zanieczyszczenia polutantami tego rodzaju wśród płazów*. Wydaje mi się, że mniej pretensjonalne jest zdanie: *Niniejsze studium dowodzi powszechności zanieczyszczenia mikroplastikiem wśród płazów*.

Str. 42 - ponieważ liczono drobiny mikroplastiku w osobnikach należy używać określenia *liczba drobin*, a nie *ilość drobin*.

Str. 44 - we wzorze na wskaźnik Levina  $p_j$  zdefiniowano jako *stosunek połączonych drobin typu morfologicznego j do całkowitej liczby połączonych drobin*. Powinno być: *stosunek liczby połączonych drobin typu morfologicznego j do całkowitej liczby połączonych drobin*.

Str. 60, tab. 8 – jest *Przewidywane*, powinno być *Przewidywane*.

W *Podsumowaniu* (str. 89) i *Wnioskach* (wniosek 3, str. 91) doktorant pisze o zależności obciążenia mikroplastikiem larw płazów od nasilenia antropopresji. Stwierdzenia te są poprawne, ale mało komunikatywne. Nie wiadomo jaki jest kierunek tej zależności. Odpowiedź można oczywiście znaleźć w *Wynikach*, ale nic nie stoi na przeszkodzie temu, żeby *Podsumowanie* i *Wnioski* od razu zawierały informację o dodatnim powiązaniu tych zmiennych.

Pytania do autora rozprawy doktorskiej

Dlaczego w modelach regresji opisanych na stronie 43 rozprawy wpływu zmiennych niezależnych na obciążenie mikroplastikiem larw płazów zastosowano model regresji z wykorzystaniem ujemnego rozkładu dwumianowego, a nie na przykład z wykorzystaniem prostszego rozkładu Poissona? Zapewne powodem była nadmierna wariancja zmiennej zależnej w odniesieniu do średniej. Ale to powinno być wyjaśnione w rozdziale *Materiał i metody* rozprawy doktorskiej.

Zebrane wyschnięte larwy płazów mierzono i ważono w warunkach laboratoryjnych. Czy w takim razie ważenie wyschniętych w różnym stopniu larw było w ogóle miarodajne? Nie jest to wyjaśnione w części metodycznej rozprawy. Wspomniano jedynie, że larwy umieszczano w 70% etanolu i później płukano wodą destylowaną.

Porównanie zdjęć stanowisk poboru prób wskazuje na to, że część stanowisk znajdowała się na terenach typowo leśnych, a część na terenach bezleśnych. Interesujące jest pytanie, czy przekładało to się na obciążenie mikroplastikiem larw płazów?

Jakie mogą być przyczyny nieobecności na badanych stanowiskach, obejmujących również stanowiska otwarte i silnie nasłonecznione (np. stanowisko S9), kijanek grzebiuszki ziemnej?

#### Podsumowanie

Doktorant w pełni zrealizował zakładane cele badawcze. Rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom wiedzy ogólnej doktoranta z zakresu funkcjonowania populacji zwierząt. Przeprowadzone badania terenowe i laboratoryjne oraz sposób zaplanowania i wykonania badań świadczą o wysokiej umiejętności prowadzenia badań naukowych. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są pionierskie i ważne z naukowego punktu widzenia. Doktorant wykazał:

- powszechność zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów;
- mniejsze obciążenie plastikiem drapieżnych larw płazów w porównaniu z larwami wszystkożernymi;
- powiązanie poziomu obciążenia mikroplastikiem larw płazów z poziomem zanieczyszczenia plastikiem zbiorników wodnych zajmowanych przez płazy.

Rozprawa została napisana w sposób bardzo klarowny i poprawny. Zwraca uwagę duża staranność doktoranta w przygotowaniu tekstu, tabel, rysunków i tłumaczeń angielskojęzycznych terminów statystycznych.

#### Wniosek końcowy:

**Rozprawa doktorska mgr Michała Szkudlarka pt. „Zanieczyszczenia mikroplastikiem płazów (Amphibia) w Polsce Zachodniej” z pewnością spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789 z późn. zm.). Wnoszę zatem o dopuszczenie mgr Michała Szkudlarka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



prof. dr hab. Piotr Zieliński