

dr hab. Adam Cudowski
Katedra Ekologii Wód
Uniwersytet w Białymstoku
15-245 Białystok
ul. Ciołkowskiego 1J

Białystok, 27.04.2025r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Marka Klimasza pt. „Analiza tkankowa
wybranych gatunków dżdżownic jako metoda szacowania stężenia
mikroplastiku w glebie”**

Celowość wyboru tematu

Od lat 50-tych XX wieku obserwowany jest intensywny rozwój przemysłu chemicznego w tym tworzyw sztucznych składających się głównie z polimerów syntetycznych lub zmodyfikowanych polimerów naturalnych oraz dodatków modyfikujących. Masowe stosowanie przez człowieka tworzyw sztucznych, które w wyniku transformacji trafiają do środowiska w postaci mikroplastiku stanowi istotne zagrożenie dla naszego zdrowia i środowiska naturalnego. Oprócz śmieci trafiających do wód, czy też rozkładających się na wysypiskach, istnieją również inne źródła mikroplastiku. Mikroplastik trafia do środowiska w wyniku ścierania się opon w trakcie jazdy, spłukiwania kosmetyków czy podczas prania tkanin syntetycznych. W związku z tym, iż aktualnie mikroplastik znajduje się praktycznie wszędzie, to problem stał się bardzo poważny i konieczne jest poszukiwanie skutecznych metod wykrywania i monitorowania tego typu zanieczyszczeń.

W związku z powyższym uważam wybór tematu rozprawy doktorskiej za bardzo aktualny i w pełni uzasadniony.

Konstrukcja pracy

Rozprawa doktorska mgr. Marka Klimasza składa się z 6 głównych rozdziałów, tj. wstępu, celów i założeń rozprawy doktorskiej, problemu badawczego, przewodnika po artykułach, wniosków oraz bibliografii. Ponadto umieszczone zostały: wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim i streszczenie w języku angielskim. Na końcu dysertacji Autor umieszcza spis tabel oraz wykresów, dorobek naukowy i działalność naukowo-dydaktyczną oraz zestaw publikacji stanowiących podstawę do

ubiegania się o stopień doktora. W rozdziale zatytułowanym problem badawczy Autor dokonuje przeglądu literatury omawiając takie zagadnienia jak:

1. Pochodzenie i klasyfikacja mikroplastiku
2. Migracja i rozprzestrzenianie się mikroplastiku w środowisku
3. Wpływ mikroplastików na organizmy
4. Metody badania mikroplastiku w glebie
5. Wpływ mikroplastiku na inżynierię środowiska, ekonomię oraz rolnictwo.

W kolejnym rozdziale, tj. przewodniku po artykułach doktorant streszcza każdy artykuł będący podstawą do ubiegania się o stopień doktora. Każdy podrozdział stanowi omówienie jednego artykułu. Rozdział ten składa się z 7 podrozdziałów, w których Autor omawia następujące zagadnienia:

1. Klasyfikacja i rodzaje mikroplastików
2. Migracja mikroplastików w środowisku
3. Oczyszczalnie ścieków jako źródło mikroplastiku w środowisku
4. Mikroplastik w glebach
5. Wpływ mikro i nanoplastiku na dżdżownice
6. Zastosowanie mikroskopii ramanowskiej w celu mapowania mikroplastiku i nanoplastiku w tkankach dżdżownic
7. Mapowanie mikroplastiku w tkankach dżdżownic jako metoda oceny zanieczyszczeń środowiska.

Pomiędzy tym rozdziałem, a kolejnym zatytułowanym wnioski doktorant umieszcza takie informacje jak: podsumowanie założeń rozprawy w odniesieniu do uzyskanych wyników, cele rozprawy, hipotezy rozprawy doktorskiej oraz innowacyjność rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska liczy 90 stron oraz załączniki stanowiące artykuły będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora, co łącznie obejmuje 224 strony rękopisu. W pracy zamieszczono 8 tabel, 19 rysunków łącznie z wykresami. W bibliografii umieszczone są 93 pozycje literaturowe. Przegląd literatury stanowią prace praktycznie anglojęzyczne, co pokazuje bardzo dobre rozeznanie doktoranta w literaturze światowej.

Treść rozprawy koresponduje z jej tytułem, a tekst w większości jest zrozumiały i czytelny, jednak sporo jest błędów literowych czy językowych. Mam kilka uwag na temat konstrukcji pracy. W moim przekonaniu spis treści nie jest jednoznaczny.

Zatytułowanie rozdziału: przewodnik po artykułach nie daje informacji czytelnikowi, czy Autor będzie dokonywał przeglądu literatury, czy też omawiał swoje osiągnięcia. Brak w spisie literatury podrozdziału 2.5. na temat wpływu mikro i nanoplastiku na dżdżownice. W rozdziale wstęp uważam, że Autor powinien przedstawić wszystkie dostępne informacje na temat mikroplastiku w środowisku oraz metodach jego identyfikacji. Pokazałoby to szerokie rozeznanie doktoranta w literaturze. Przegląd literatury jednak został dokonany w rozdziale problem badawczy, a w rozdziale „wstęp” Autor dzieli się z czytelnikiem przemyśleniami na temat mikroplastiku. Przedstawione w rozprawie doktorskiej wykresy są jak dla mnie mało czytelne (za małe). Warto byłoby wszystkie umieszczone wykresy czy też tabele sformatować i ujednolicić, przedstawiając je w tym samym stylu. W kilku miejscach w pracy wyniki własne są pomieszczone z danymi literaturowymi, co wprowadza czytelnika w zakłopotanie i utrudnia zrozumienie treści. Rozdział bibliografia niestety jest przedstawiony w sposób nieco chaotyczny, bowiem nie ma jednoznacznego szablonu zestawienia artykułów. Chociażby w jednym z artykułów rok wydania publikacji jest pogrubiony i znajduje się tuż za nazwiskami autorów, w innym z kolei za tytułem czasopisma, którego nazwa raz jest zapisana skrótem a raz podana w pełnym brzmieniu. Jest to niestety dla mnie mało profesjonalne. Wszystkie powyższe uwagi wynikają wyłącznie z subiektywnego podejścia recenzenta do konstrukcji i wyglądu rozprawy doktorskiej, nie mniej jednak moje uwagi nie umniejszą jakości pracy.

Ocena merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa posiada znaczną wartość naukową i poznawczą. Dotyczy ważnego zagadnienia jakim jest zanieczyszczenie środowiska mikroplastikiem, spowodowane wzrostem produkcji tworzyw polimerowych, przez co znacznie zwiększyła się ilość odpadów plastikowych. Problem jest ogromny bowiem dotyczy niekontrolowanych wysypisk, plaż czy akwenów wodnych, gdzie odpady z tworzyw stanowią tzw. wyspy śmieci. Wszechobecny mikroplastik wpływa na całe ekosystemy wodne, w szczególności na organizmy, które go połykają. Zanieczyszczenie wód mikroplastikiem wpływa na funkcjonowanie tak roślin wodnych, jak i organizmów planktonowych czy ryb, co może prowadzić do dezorganizacji całego ekosystemu. Mikroplastik nie tylko wpływa na funkcjonowanie środowiska wodnego, ale również i lądowego. Mikroplastik w glebie stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia roślin, zwierząt i ludzi. Niszczy on strukturę gleby, zmniejsza zdolność gleby do

zatrzymywania wody, utrudnia m. in. infiltrację wody deszczowej. W związku z tym iż zanieczyszczenie tworzywami sztucznymi to szybko pogłębiająca się katastrofa ekologiczna, uważam, iż poruszony przez Pana Klimasza temat jest bardzo aktualny i badania w tym zakresie są bardzo potrzebne.

Pan Marek Klimasz w swojej rozprawie doktorskiej zajął się problemem mikroplastiku w środowisku, kładąc nacisk na glebę. Usystematyzował On klasyfikację i nomenklaturę mikroplastiku zwracając uwagę na istniejące rozbieżności w literaturze. Przedstawił możliwe drogi degradacji polimerów w zależności od warunków tlenowych. Pan magister przedstawił również migrację mikroplastiku w środowisku wskazując dodatkowo na najbardziej zanieczyszczone mikroplastikiem wody potamiczne na świecie. Dodatkowo w przedstawionej rozprawie doktorskiej Pan Klimasz zwraca uwagę na wykorzystanie osadów ściekowych w rolnictwie i skutki środowiskowe jakie to za sobą niesie. Główna część rozprawy doktorskiej stanowi charakterystykę mikroplastiku w glebie, jego kumulację przez dżdżownice oraz zastosowanie metody opisującej zawartości mikroplastiku w glebie na podstawie analizy tkankowej dżdżownic (mikroskopii Ramana).

Streszczenie prezentuje najważniejsze elementy pracy, poczynając od nomenklatury związanej z mikroplastikiem, przez jego kumulację w organizmach zwierzęcych, po wykazanie roli dżdżownic jako bioindykatorów zanieczyszczenia gleb mikroplastikiem. Ta część pracy wyjaśnia jakie gatunki dżdżownic zostały poddane badaniom i z jakiego powodu oraz jaki mikroplastik wykorzystano do analiz. Wskazane zostały również metody prowadzonych badań.

Wstęp ma na celu, jak zrozumiał recenzent, wyjaśnić strukturę rozprawy doktorskiej, celowość podjętych zagadnień i podzielić się refleksją Autora na temat roli i występowania mikroplastiku. Dodatkowo w rozdziale tym poruszane są takie zagadnienia jak motywacja i uzasadnienie podjęcia tematu, lecz nie wiadomo czy są one zaliczane do rozdziału wstęp czy też stanowią osobny rozdział nie ujęty w spisie literatury.

Cele i założenia rozprawy doktorskiej – ta część pracy została podzielona na szczegółowe cele biologiczne, techniczne i utylitarne, a także przedstawione zostały tu hipotezy rozprawy doktorskiej. Do celów ogólnych Autor zaliczył określenie możliwości zastosowania analizy tkankowej wybranych gatunków dżdżownic do

oszacowania zawartości mikroplastiku w glebie jako wskaźnika. Ponadto za cel ogólny przyjęto również wskazanie skutecznej procedury separacji gęstościowej oraz opisanie detekcji wybranych tworzyw sztucznych w tkankach.

Problem badawczy został szeroko omówiony przez sklasyfikowanie mikroplastiku, określenie jego pochodzenia a także transformacje jakim on ulega w środowisku. Przedstawione zostały metody badania mikroplastiku w pedosferze oraz jego wpływie na organizmy, inżynierię środowiska, ekonomię oraz rolnictwo. Każdy podrozdział stanowiący przegląd literatury kończy się postawieniem przez Autora problemów badawczych. Pan mgr Klimasz wskazuje na następujące problemy badawcze:

1. „... złożoność rodzajowa mikroplastiku, różnorodność względem kształtu, barwy, gęstości oraz rozmiaru, a także wciąż rozwijający się przemysł tworzyw i powstawanie nowych materiałów o odmiennych właściwościach”.
2. „... brak kontroli nad rozprzestrzenieniem się mikroplastiku w środowisku naturalnym, jego mobilność hydrologiczna oraz atmosferyczna, a także rosnące stężenie w glebach nawożonych osadami ściekowymi”.
3. „... obecność mikroplastiku w organizmach różnych gatunków zwierząt i roślin oraz brak wiedzy na temat długotrwałej ekspozycji na to zanieczyszczenie, dodatkowo problemem jest wpływ bezpośredni mikroplastiku skutkujący stresem oksydacyjnym, zaburzeniem wzrostu oraz reprodukcji, spadkiem masy organizmów oraz uszkodzeniami tkankowymi”.
4. „... złożona matryca jaką jest gleba oraz brak jednolitej metody określającej zawartość w niej tworzyw sztucznych. W przypadku inżynierii środowiska oraz wszystkich założeń mających na celu rekultywację gleb czy ogólnie ich ochronę, skuteczna i wysoce powtarzalna metoda oznaczania jest kluczowa. Przy tak dużej ilości zmiennych, szanse na błędy pomiarowe nawet w obrębie jednego badania są niezerowe, a wręcz spore”.
5. „... brak realnej oceny widma nadchodzących zmian, mających na celu ograniczenie wykorzystywania tworzyw sztucznych, na przykład w rolnictwie. To nie wszystko, Gospodarka Obiegu Zamkniętego (GOZ) oraz regulacje „Zielonego Ładu” (opisywanego w załączonym artykule) mogą w znacznym stopniu przyczynić się do wykorzystywania osadów ściekowych w rolnictwie nie tylko pod uprawy roślin przeznaczonych dla zwierząt czy pastwiska, ale też pod grunty orne roślin

przeznaczonych dla ludzi, co oznacza, że zanieczyszczenie gleb mikroplastikiem i wpływ na organizmy może stanowić w przyszłości ogromne zagrożenie”.

Przewodnik po artykułach – ta część pracy została podzielona na 7 podrozdziałów w których to Autor streszcza poszczególne artykuły. Podrozdział pierwszy zatytułowany: klasyfikacja i rodzaje mikroplastiku zawiera informację na temat ogólnej charakterystyki mikroplastiku, jego nomenklatury sposobów degradacji, a także ogólnego zastosowania tworzyw sztucznych i charakterystykę poszczególnych polimerów. W rozdziale tym Autor porządkuje wiadomości na temat mikroplastiku i wskazuje na rozbieżności jakie pojawiają się w literaturze światowej. W podrozdziale drugim Autor zebrał aktualne dane na temat występowania mikroplastiku w ujęciu globalnym. Przedstawił: skalę prowadzonych badań i kierunki ich działania oraz przyczyny przeszacowania lub niedoszacowania wyników. W tej części pracy Autor wskazuje na problem metodyczny związany z zastosowaniem różnorodnych metod, do określania stopnia zanieczyszczenia środowiska mikroplastikiem, które dają różne niemiernodajne wyniki. Podrozdział trzeci stanowi dyskusję na temat wykorzystania osadów ściekowych w rolnictwie, gdzie przedstawione zostały informacje na temat tak zalet jak i wad ich zastosowania. Autor przedstawia skalę zastosowania osadów ściekowych w różnych częściach świata i ich wpływ na wzrost zawartości mikroplastiku w glebie. Autor wskazuje, że zastosowanie wydajnego procesu filtracyjnego oczyszczalni ścieków dysponującej II oraz III stopniem oczyszczania nie jest wystarczający, aby ograniczyć przedostawanie się mikroplastiku do środowiska. Kolejny podrozdział (czwarty) opisuje źródła mikroplastiku w glebie, jego obecność i zawartość w glebach w różnych rejonach świata. W rozdziale tym Autor opisuje badania obejmujące analizę roślin, których nasiona kiełkowały w kontenerach wypełnionych, zawierającą mikroplastik glebą, w której znajdowały się dżdżownice. Mikroskopowe badania wykazały obecność w łodydze oraz liściach polietylenu o niskiej gęstości, który wykazuje właściwości fluorescencyjne. Na podstawie przeprowadzonych badań Pan magister wskazuje, iż na ostateczny wynik zawartości mikroplastiku w glebie może mieć wpływ intensywny wzrost roślin, w tym zbóż, który wiąże się z częściową translokacją tworzywa, a tym samym otrzymane wyniki mogą być niemiernodajne. Pan Klimasz stwierdza, iż „w tym przypadku należy, dla każdego rodzaju gleby oraz obszaru - zróżnicować metodykę pomiarową oraz wziąć poprawkę na obecną tam roślinność”. W podrozdziale tym, znajdziemy również informacje na

temat zastosowania metod wyizolowania tworzywa z gleby, na zasadzie różnic w ich gęstości i tym samym wyporności i jak podaje Autor metody te mogą być stosowane komercyjnie ze względu na wykorzystanie wyłącznie tych odczynników, które są bezpieczne dla środowiska, a ich koszt jest niewielki. W trakcie badań doktorant napotkał na szereg problemów, wynikających m. in. z właściwości polimerów czy stosowanych związków chemicznych, np. jak podaje Autor: polietylen wykazywał wysoką polarność przez co przylegał do ścian naczyń, a zastosowanie tkanin filtracyjnych czy membran obarczone było wysokim prawdopodobieństwem pominięcia drobnych fragmentów. Z kolei etylen o stężeniu (99,7%) przy dłuższej ekspozycji odbarwiał cząstki, co według Autorów mogło wpłynąć na przyspieszenie fragmentacji. W związku z powyższym, jak podaje Autor uzyskane przez Niego wyniki były diametralnie różne, od tych jakie widnieją w literaturze. Mimo bardzo krytycznego spojrzenia doktoranta na uzyskane przez Niego wyniki uważam, iż są one niezmiernie cenne bowiem, wyraźnie wskazują na ograniczenia powszechnie stosowanych przez wielu badaczy fizyko-chemicznych metod w tego typu badaniach. Pan Klimasz stwierdza, iż dalsze badania mikroplastiku w glebie są szalenie istotne dla inżynierii środowiska, bowiem ta zajmuje się między innymi przywracaniem gleby do jej pierwotnych właściwości oraz rekultywacją. Jednak, jak stwierdza Autor wiedza z zakresu mikroplastiku w pedosferze jest bardzo mało poznana i wciąż nie ma odpowiedzi na wiele pytań. W podrozdziale piątym Autor opisuje wpływ mikro i nanoplastiku na: *Lumbricus terrestris*, *Dendrobaena veneta*, *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* oraz *Aporrectodea caliginosea*. Celem przeprowadzonych badań, jak podaje Autor, było porównanie wrażliwości poszczególnych gatunków dżdżownic na różne rodzaje mikroplastiku. W badaniu pilotażowym zastosowano mikroplastik posiadający właściwości fluorescencyjne o wielkości 1-5 μm , 10-20 μm , 32-38 μm , 38-45 μm , 53-63 μm w celu prześledzenia drogi migracji cząstek z gleby do ciała dżdżownicy i określenia dokładnego położenia - mapowania przestrzennego. Wyniki badań pokazały, iż po upływie 30 dni istnieje możliwość wykrycia cząstek mikroplastiku w tkankach dżdżownic. Do badań właściwych Autor zastosował tworzywa o różnej wielkości i pochodzeniu, co było pionierskie w tego typu badaniach. Uzyskane wyniki potwierdziły dane literaturowe i pozwoliły wskazać *Lumbricus terrestris* i *Dendrobaena veneta* jako gatunki dżdżownic, które najlepiej przystosowały się do życia w glebie zanieczyszczonej mikroplastikiem. Jak podaje Autor wszystkie badane gatunki

dżdżownic poddane działaniu mikroplastiku o zawartości w glebie równym 1% odznaczały się podwyższonym stężeniem GST, zmniejszonym współczynnikiem przeżywalności osobniczej, a także znacznym zubożeniem obfitości flory bakteryjnej. W podrozdziale szóstym Autor opisuje mikroskopię ramanowską jako narzędzie służące mapowaniu mikroplastiku i nanoplastiku w tkankach dżdżownic. Ponadto mikroskopia ramanowska posłużyła jako narzędzie do określenia wielkości cząstek tworzywa oraz widma emisji dla poszczególnych tworzyw. W części tej Pan magister opisuje problemy z jakimi napotkał się w trakcie badań z wykorzystaniem mikroskopii ramanowskiej. Wyzwaniem było m. in. ustawienie linii lasera i wzbudzenia fali, wykorzystanie obiektywu o konkretnym powiększeniu, dobranie rozdzielczości spektralnej, mocy promieniowania lasera, kroków pomiarowych, rozdzielczości przestrzennej oraz gęstości próbkowania. W związku z tym, iż każdy rodzaj tworzywa charakteryzuje się różnym widmem, a tkanka dżdżownic również wykazuje właściwości fluorescencyjne wymuszało to określenie dokładnych parametrów, aby w dalszych badaniach można było uznać to jako tło pomiarowe. Zastosowanie z jednej strony tak dokładnej metody, a z drugiej zaś bardzo czasochłonnej i pracochłonnej ewidentnie wskazuje na ogrom włożonej przez doktoranta pracy laboratoryjnej. W ostatnim (siódmym) podrozdziale Autor opisuje zastosowanie mapowania mikroplastiku w tkankach dżdżownic jako metody służącej to określenia zawartości mikroplastiku w glebie oraz modelowanie matematyczne mające na celu potwierdzenie korelacji pomiędzy zawartością mikroplastiku w glebie a jego zawartością w tkankach. **Wnioski** – rozdział ten w opinii recenzenta jest formą streszczenia a nie wyciągniętych wniosków. Uważam, iż wnioski powinny być krótkie i wypunktowane, a nie powinny przyjmować postaci opisowej. Jest to jednak wyłącznie moja subiektywna ocena, która nie umniejsza jakości pracy. Uważam, iż ogromną wartością niniejszej rozprawy jest wyłonienie dwóch gatunków dżdżownic (*Lumbricus terrestris* oraz *Dendrobaena veneta*), które mogą być bioindykatorami zanieczyszczenia gleby mikroplastikiem.

Uwagi ogólne do przedstawionej rozprawy doktorskiej

1. Uważam, że nie powinno używać się pojęcia stężenie w odniesieniu do zawartości ciała stałego (mikroplastiku) w ciele stałym (glebie czy tkankach dżdżownic).
2. Pan magister stosuje potoczne określenia, np.: „zawartość organiki w glebie” – strona 15, jednak powinno się mówić o zawartości materii organicznej w glebie.

3. Autor podaje że prowadził badania, które „objęły także analizę roślin, kiełkujących w kontenerach” – strona 45. Pojęcie kiełkowania dotyczy nasion a nie odnosi się do roślin.
4. Poszczególne podrozdziały wchodzące w skład tzw. przewodnika po artykułach, stanowiące tzw. trzon doktoratu, powinny być opisane bardziej szczegółowo, a tym samym Autor w mniejszym stopniu winien odwoływać czytelnika do dołączonych artykułów.

Wszystkie powyższe uwagi wynikają wyłącznie z subiektywnego odczucia recenzenta i nie umniejszą jakości rozprawy doktorskiej.

Po szczegółowym zapoznaniu się z rozprawą doktorską zrodziły mi się następujące pytania związane z występowaniem mikroplastiku w środowisku:

1. Jak mikroplastik wpływa na mikroorganizmy?
2. W jaki sposób można ograniczyć mikroplastik w glebie?
3. Jak wygląda migracja mikroplastiku w różnych typach gleb, np. jak w torfie a jak w madach czy glebach, np. bielcowych czy gliniastych?

Wniosek końcowy

Podkreślić należy wielowątkowość rozprawy oraz jej charakter wiążący aspekty zarówno chemiczne, biologiczne, jak i środowiskowe, co nie ułatwia bezbłędnego opracowania. W związku z tym, iż obecność mikroplastiku w środowisku naturalnym stanowi poważne zagrożenie dla wszystkich organizmów, stąd też podjęty temat jest szalenie istotny zwłaszcza w badaniach środowiskowych.

Na pewno część uwag ma charakter dyskusyjny, część należy wyjaśnić, a niektóre fragmenty pracy doprecyzować. Pracę uważam za bardzo pracochłonną i wnoszącą nowe wartości naukowe, praktyczne i użyteczne w zakresie badań środowiskowych.

Oceniana rozprawa świadczy o dużych umiejętnościach Autora w organizowaniu badań, opanowaniu metod badawczych oraz możliwościach samodzielnego rozwiązania postawionego celu badawczego i właściwego wnioskowania na podstawie wyników. Treść ocenianej pracy kwalifikuje **mgr. Marka Klimasza** do ubiegania się o stopień doktora w dziedzinie nauk inżyniersko-technicznych w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska odpowiada wymaganiom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Stawiam wniosek o przyjęcie pracy **mgr. Marka Klimasza** pt. **„Analiza tkankowa wybranych gatunków dżdżownic jako metoda szacowania stężenia mikroplastiku w glebie”** jako rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Autora do publicznej obrony.

Białystok, 27.04.2025 r.



.....