

Streszczenie

Szybki rozwój gospodarki i intensywna eksploatacja zasobów środowiska oraz związana z tymi zjawiskami nasilająca się antropopresja, zmusza nas do myślenia o przyszłych pokoleniach. Bezpośrednimi groźnymi skutkami wpływu działalności człowieka na środowisko morskie są m.in.: zanieczyszczenie niepożądanymi substancjami chemicznymi, wzrost temperatury wód związany ze zmianami klimatu, eutrofizacja, inwazje gatunków obcych czy przełowienie spowodowane nadmierną eksploatacją populacji w stosunku do zdolności ich samoodtwarzania (HELCOM 2018; Jakubowska i in. 2002). Uważana obserwacja otaczającego nas środowiska i wnikliwa analiza wpływu czynników pochodzenia antropogenicznego są ważnymi elementami ochrony otaczającego nas świata. Wpływ działalności ludzkiej na środowisko można monitorować stosując międzynarodowe wytyczne, jak np. zalecenia zawarte w Ramowej Dyrektywie Wodnej (2000/60/WE), poprzez analizę elementów biologicznych, hydrologicznych czy fizyko-chemicznych. Jednak do tego celu najlepiej zastosować wskaźniki oparte na badaniach całych zbiorowisk, gdyż tylko odpowiednio bogate zgrupowanie gatunków o różnorodnych wymaganiach ekologicznych jest w stanie dostarczyć pełnej informacji o skutkach czynników związanych z antropopresją (Pennesi i Danovaro 2017). Stąd w niniejszej pracy podjęto się zbadania i opisanie zmian zachodzących w zbiorowiskach mikrofitobentosu wywołanych wybranymi czynnikami towarzyszącymi działalnością człowieka.

Mikrofitobentos w pracy zdefiniowano w szeroki sposób jako formację, w której skład wchodzi mikroorganizmy roślinne związane z dnem lub różnego rodzaju podłożem znajdującym się w wodzie (Cahoon 2019). Jest on częścią mikroekosystemu, w którym zachodzą interakcje pomiędzy organizmami, a ich środowiskiem jak w każdym ekosystemie (Bosserman 1983). Ma on ogromne znaczenie pod względem funkcjonalnym, zwłaszcza dla ekosystemów stref przybrzeżnych, estuariów czy płytkich mórz, ponieważ w jego skład wchodzi organizmy, które są istotnymi producentami i ważnym elementem łańcucha troficznego. Organizmy tworzące zbiorowiska mikrofitobentosu uważa się za wiarygodne wskaźniki zmian środowiskowych ze względu na ich szybką reakcję na czynniki zarówno abiotyczne jak i biotyczne (Potapova i Charles 2007). Ich wykorzystanie zarówno w badaniach monitoringowych, jak i ekotoksykologicznych, ma bogatą i długą historię sięgającą XIX wieku (np. Dickman 1969; Blanck 1985; Schmitt-Jansen i Altenburger 2005; Roubeix i in. 2011; Zhu i in. 2021). Czynniki pochodzenia naturalnego czy sztucznego nie tylko ograniczają wzrost i

rozwój mikroorganizmów roślinnych, ale również kształtują strukturę i funkcjonowanie całych zbiorowisk. Dużą zaletą badań z wykorzystaniem zbiorowisk mikrofitobentosu jest łatwość ich pozyskiwania ze środowiska (Dahl i Blanck 1996; Blanck i in. 2009; Sylwestrzak i in. 2014a, **ARTYKUŁ 1, 2, 3**). Ponadto literatura przedmiotu dotycząca badań prowadzonych na mikrofitobentosie to cenne źródło informacji w praktycznych zastosowaniach tej formacji (np. Dahl i Blanck 1996; Underwood i in. 1999, Cohn i McGuire 2000; Underwood i in. 2004; De La Iglesia i in. 2013; Vannoni i in. 2022). W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie zastosowaniem zbiorowisk mikrofitobentosu w badaniach ekotoksykologicznych testujących między innymi potencjalnie toksyczne substancje pochodzenia antropogenicznego (np. Blanck i in. 2009; Araújo i in. 2010; Åsa Arrhenius i in. 2014; Bácsi i in. 2016; Pennesi i Danovaro 2017; Du i in. 2021; Vannoni i in. 2022). Na przykład, na zbiorowiskach morskiego mikrofitobentosu przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem substancji i farb antyporostowych (Blanck i in. 2009; Arrhenius i in. 2014), leków (Pérez i in. 2009), kosmetyków (Mason i in. 1996), czy preparatów chwastobójczych (Downing i in. 2004). Między innymi te prace naukowe stanowiły przyczynek do zaplanowania badań w ramach dysertacji, w których wykorzystano potencjał bioindykacyjny całych zbiorowisk. Dużą nowością było zastosowanie zbiorowisk pozyskanych bezpośrednio ze środowiska, co pozwoliło uzyskać nowe, interesujące wyniki dotyczące reakcji zbiorowisk na substancje pochodzenia antropogenicznego.

Badania stanowiące podstawę pracy doktorskiej zdecydowano oprzeć się o analizę wpływu czynników związanych z dwoma typami presji antropogenicznej – zanieczyszczeniem wywołanym wprowadzaniem substancji chemicznych do środowiska i wzrostami temperatury wywołanymi zmianami klimatycznymi. Do analizy reakcji zbiorowisk mikrofitobentosu na zanieczyszczenia chemiczne wybrano trzy substancje z różnych grup chemicznych o odmiennym sposobie oddziaływania i zróżnicowanym stopniu rozpoznania. Jedną z zastosowanych substancji był chlorek miedzi (II) (**ARTYKUŁ 1**). Miedź ma istotne znaczenie funkcjonalne dla wodnych mikroorganizmów roślinnych, a mechanizm jej działania jest stosunkowo dobrze rozpoznany (Stauber i Florence 1987; Manimaran i in. 2012; Serwatka i in. 2015; Li i in. 2021). Jest składnikiem wielu białek i enzymów, biorących udział w szlakach metabolicznych, stąd odgrywa on istotną rolę w metabolizmie organizmów fotosyntetyzujących (Morelli i Scarano 2004). Jednak w nadmiarze, może zaburzać procesy fizjologiczne. Przy wysokich stężeniach oraz długotrwałej ekspozycji jony miedzi hamują fotosyntezę (Fernandes i Henriques 1991; Guasch i in. 2002) generując stres oksydacyjny

poprzez indukcję produkcji reaktywnych form tlenu (Morelli i Scarano 2004) i wpływają na procesy metaboliczne związane również ze wzrostem (Maksymiec i Krupa 2006) oraz na skład biochemiczny, m.in. zawartość karotenoidów, białek, lipidów i węglowodanów (Neethu i in. 2021). Jony miedzi wykorzystuje się jako jeden z składników farb antyporostowych, ponieważ negatywnie oddziałują na kondycję mikroglonów (Traon i in. 2021).

Kolejną zastosowaną substancją był glifosat w postaci preparatu Roundup® (**ARTYKUŁ 2**). Glifosat to związek organiczny z grupy fosfonianów, który jest substancją o szerokim spektrum aktywności biologicznej stosowaną w wielu herbicydach. W skład środków chwastobójczych obok glifosatu, jako substancji aktywnej, wchodzi wiele substancji pomocniczych. Roundup® ze względu na swój złożony skład oraz szybkie tempo rozpadu może być źródłem węgla i azotu, a jego niskie stężenia mogą stymulować wzrost komórek mikroglonów (Malik i in. 1989; Wong 2000; Berman i in. 2020). W trakcie wieloletnich badań nad zawartością pestycydów w wodach powierzchniowych wykazano iż najczęściej występujące pestycydy to bentazon oraz glifosat (Stenström i in. 2021). Glifosat jako pestycyd jest stosowany na coraz większą skalę ze względu na masowy rozwój produkcji rolnej, wysoką wydajność preparatów chwastobójczych z tą substancją, ich niski koszt produkcji oraz wciąż liberalne prawo w wielu krajach z wysoko rozwiniętą gospodarką rolną (Brovini i in. 2021). Związek ten po przedostaniu się do komórek rośliny hamuje np. produkcję enzymu syntetazy EPSP (5-enolopirogroniano-szikimo-3-fosforanu), która spowalnia tworzenie przez organizm aminokwasów aromatycznych ważnych dla wzrostu oraz wchodzących w skład wielu barwników roślinnych (Franz i in. 1997). Zmniejszona ilość lub brak barwników fotosyntetycznych prowadzi do uszkodzenia struktury chloroplastów i degradacji komórek (np. Sylwestrzak i in. 2015b; Kim i Ponomarev 2021).

Ostatnią substancją był chlorek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy [BMIM]Cl, który pod względem budowy chemicznej przynależy do grupy cieczy jonowych (**ARTYKUŁ 3**). Ciecze jonowe to substancje, które zyskują coraz większą popularność ze względu na ich potencjalnie pożądane właściwości takie jak: niepalność, wysoka stabilność termiczna i elektrochemiczna, niska prężność par, dobre przewodnictwo i doskonałe właściwości katalityczne (Mai i in. 2014; Chen i in. 2020). Wymienione powyżej własności odpowiadają wymaganiom stawianym produktom tzw. zielonej chemii. Jednak po latach badań „zielony” charakter cieczy jonowych został zakwestionowany, chociaż mechanizm toksycznego oddziaływania tych związków wciąż nie jest dobrze poznany (Nikitenko i in., 2007; Freire i in., 2010; Kumar i in., 2011; de Jesus i Filho, 2022; Maculewicz i in., 2022).

Spośród czynników związanych ze zmianami klimatycznymi, w ramach pracy badano wpływ krótkookresowego nagłego wzrostu temperatury wody na organizmy tworzące zbiorowiska mikrofitobentosu (**ARTYKUŁ 4**). Jak wykazano ogromne znaczenie dla środowiska ma nie tylko stale wzrastająca temperatura, ale także częstotliwość i intensywność ekstremalnych zjawisk klimatycznych takich jak fale upałów (Vieira i in. 2013). Na podstawie badań prowadzonych w ostatnich latach wykazano, że latem w południowym Bałtyku średnie temperatury wody przybrzeżnej wynoszą ok. 19° C, ale w krótkich przedziałach czasu wartości temperatury wzrastają powyżej 23° C (Siegel i in. 2006; Bradtke i in. 2010; Rak i Wieczorek 2012; Stramska i Białogrodzka 2015). Wyniki badań prowadzonych we wcześniejszych latach sugerują, iż zbiorowiska mikrofitobentosu mogą podlegać dużym zmianom spowodowanym wzrostem temperatury. Wyniki prac prowadzonych na zbiorowiskach mikrofitobentosu zdominowanych przez okrzemki wskazują, że krótkookresowe wzrosty temperatury stymulują fotosyntezę, natomiast długotrwała ekspozycja na wyższą temperaturę prowadzi do zmniejszenia wydajności fotosyntezy oraz do zmian w składzie gatunkowym i intensywnego rozwoju sinic (Hicks i in. 2011; Vieira i in. 2013; Cartaxana i in. 2015; Kazanjian i in. 2018).

Opisane powyżej czynniki mają ogromny wpływ na funkcjonowanie mikroorganizmów roślinnych, stąd wykorzystanie ich do testowania reakcji zbiorowisk mikrofitobentosu ma odpowiednie uzasadnienie. Warto podkreślić, że organizmy morskie związane ze środowiskiem brakicznym dotychczas rzadko były stosowane w testach ekotoksykologicznych. Przeważającą część testów ekotoksykologicznych prowadzi się na szczepach glonów, np. testy rekomendowane przez OECD (OECD, 1984; OECD, 2006) lub Międzynarodową Organizację Normalizacyjną (ISO 2012). Testy prowadzone według ustandaryzowanych metodyk na wybranych monokulturach są niezwykle cenne ponieważ pozwalają na porównanie stopnia wpływu różnych substancji, jednak dają informację tylko na temat reakcji nielicznych, wybranych organizmów. Ponadto wiele gatunków rekomendowanych w testach toksykologicznych jest utrzymywanych przez długi czas w sztucznych warunkach laboratoryjnych, do których się adaptują np.: *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Beijerinck) jest utrzymywana w monokulturze od 1889 roku (Beijerinck 1890), *Navicula pelliculosa* (Kützing) Hilse od 1955 roku (Lewin 1955), a *Selenastrum capricornutum* Printz od 1959 roku (Guiry 2013). Analiza wpływu czynników pochodzenia antropogenicznego na naturalne zbiorowiska mikrofitobentosu to stosunkowo nowe, innowacyjne podejście stosowane w testach ekotoksykologicznych. Pomimo, iż takie badania prowadzi się od ponad 20 lat, to wciąż nie opracowano standardowej metodyki prowadzenia

testów, a stosowane w trakcie badań techniki pomiarowe są różnorodne (Cibic i in. 2008; Duong i in. 2008; Morin i in. 2017). W ramach pracy doktorskiej przetestowano szereg narzędzi i metodyk prowadzenia testów ekotoksykologicznych na zbiorowiskach mikrofitobentosu, co niewątpliwie stanowi interesujący wkład w rozwój tej dziedziny nauki (Dahl i Blanck 1996; Perkins i in. 2001; Serôdio 2004; Araújo i in. 2010; Åsa Arrhenius i in. 2014;).

Głównym celem dysertacji było scharakteryzowanie reakcji zbiorowisk mikrofitobentosu bałtyckiego wywołanej oddziaływaniem czynników określanych jako czynniki pochodzenia antropogenicznego - substancji z różnych grup chemicznych, tj. chlorku miedzi (II), glifosatu (w postaci Roundup®) i cieczy jonowej [BMIM]Cl oraz krótkookresowego nagłego wzrostu temperatury wody.

W pracy założono następującą hipotezę badawczą:

Wprowadzenie do środowiska zanieczyszczeń w postaci: chlorku miedzi (II), glifosatu (jako Roundup®), cieczy jonowej [BMIM]Cl oraz krótkookresowy nagły wzrost temperatury wpływają na skład i strukturę zbiorowisk mikrofitobentosu Zatoki Gdańskiej, a zmiany te można oszacować poprzez obserwację komórek mikroorganizmów wchodzących w skład zbiorowisk mikrofitobentosu.

Przeprowadzenie eksperymentów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej wymagało wykonania szeregu wstępnych badań, które pozwoliły na opracowanie najodpowiedniejszej metodyki do oceny zmian zachodzących w zbiorowiskach mikrofitobentosu pod wpływem wybranych czynników. Rozpoznanie materiału badawczego tj. składu i struktury mikrofitobentosu bałtyckiego miało miejsce w ramach realizacji pracy magisterskiej Z. Sylwestrzak zatytułowanej „Sukcesja zbiorowisk mikrofitobentosu w Zatoce Gdańskiej (badania eksperymentalne)”, a także na podstawie bogatej literatury przedmiotu. Eksperymenty przeprowadzone w początkowych etapach pracy doktorskiej miały na celu przetestowanie m. in.:

- optymalnego czasu ekspozycji w środowisku szkiełek hodowlanych, z których pozyskiwano organizmy tworzące zbiorowiska mikrofitobentosu (Sylwestrzak, Zgrundo i Pniewski 2014);

- wpływu medium hodowlanego (woda morska i standardowa pożywka f/2) na wyniki testów ekotoksykologicznych prowadzonych na zbiorowiskach mikrofitobentosu (Sylwestrzak i Pniewski, 2014; Sylwestrzak i Zgrundo 2014).

Ze względu na fakt, iż powszechnie stosowane metody oceny kondycji mikroorganizmów, np. koncentracja barwników fotosyntetycznych lub aktywność fotosyntezy (fluorescencja typu PAM) (Brotas i in. 2007; Morelle i in. 2018), często nie dostarczały jednoznacznych wyników, dlatego w trakcie wstępnych badań przetestowano inne mniej popularne wskaźniki, takie jak:

- przeżywalność przedstawicieli poszczególnych taksonów mikrofitobentosu, wyznaczaną jako stosunek komórek żywych do martwych (Sylwestrzak i Zgrundo 2014).
- kondycja komórek przedstawicieli mikrofitobentosu w odniesieniu do stanu chloroplastów. Kondycję określano na podstawie zmian w kształcie i strukturze chloroplastów zgodnie z wcześniej opracowaną metodyką badań (Sylwestrzak 2014; Sylwestrzak i Pniewski 2014; Sylwestrzak i in. 2015). Przykłady i fotografie mikroskopowe komórek z prawidłowo wykształconymi chloroplastami i chloroplastami o nieprawidłowym kształcie przedstawiono na Fig. 1.

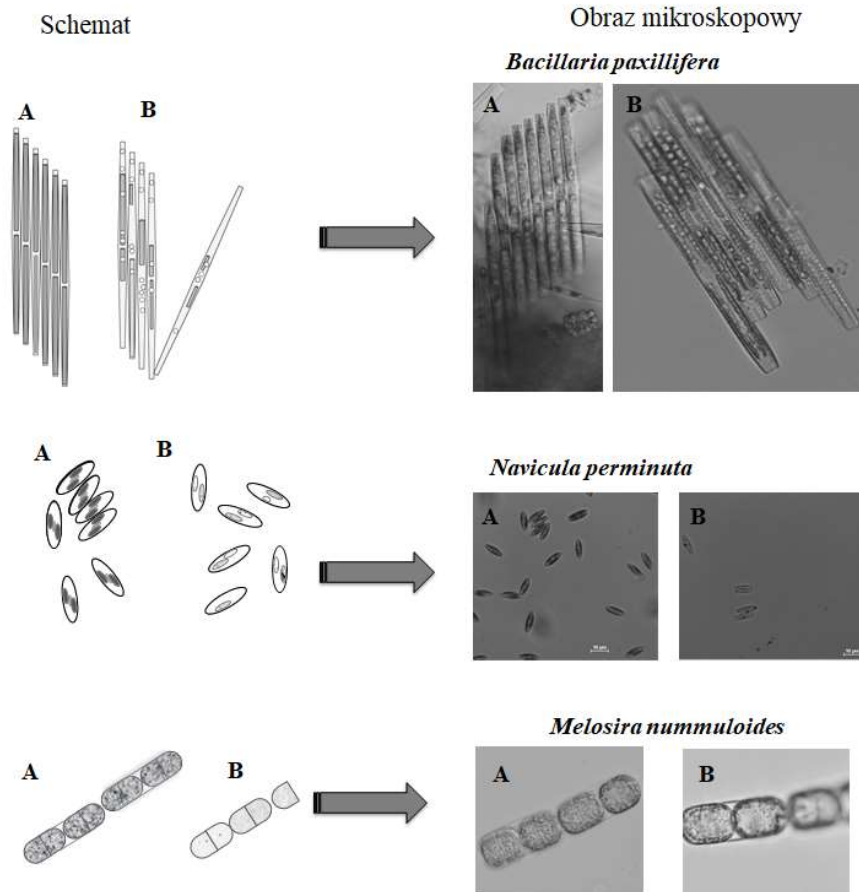


Fig. 1. Przykłady komórek z prawidłowo wykształconymi chloroplastami (A) i chloroplastami o nieprawidłowym kształcie (B) dla *Bacillaria paxillifera*, *Navicula perminuta*, *Melosira nummuloides* zobrazowane w postaci schematu i zdjęć komórek spod mikroskopu świetlnego.

Materiał wykorzystany w docelowych testach stanowiły zbiorowiska mikrofitobentosu pozyskane ze szkiełek eksponowanych w przybrzeżnej strefie Zatoki Gdańskiej (południowy Bałtyk) przez okres 14 dni w lipcu i sierpniu 2015 r. W trakcie ekspozycji szkiełek temperatura wody oscylowała pomiędzy wartościami 17°C i 19 °C, a zasolenie zmieniało się w zakresie od 7,9 do 8,4 PSU. Metodę prac terenowych szczegółowo opisano w artykułach wchodzących w skład niniejszej dysertacji (ARTYKUŁ 1, 2, 3 i 4). Po przetransportowaniu paneli hodowlanych do laboratorium zbiorowiska mikrofitobentosu zeskrobywano ze szkiełek hodowlanych skalpelem, wysycano gazowym azotem w celu wywołania hipoksji oraz poddawano sonifikacji. Dzięki zastosowaniu powyższych procedur z roztworu mikrofitobentosu wyeliminowano organizmy zwierzęce, a materiał badawczy został

ujednolicony (Rosenberg i in. 1991). Następnie mikrofitobentos umieszczano w 250 ml kolbach w 100 ml przefiltrowanej wody morskiej zebranej *in situ*. Niezależnie od eksperymentu średnia liczebność zbiorowisk w momencie rozpoczęcia testów wynosiła 41319 (\pm 1133), a 95% całego zbiorowiska stanowiły okrzemki. Wyjściowe stężenia związków biogenicznych w wodzie morskiej wynosiły: $9,4 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \text{ N-NH}_4$, $102 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \text{ N-NO}_3$, $36 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \text{ P-PO}_4$, $600 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \text{ Si-SiO}_4$. W trakcie badań wstępnych przeprowadzono analizę składników biogenych przed rozpoczęciem i po zakończeniu testów. Na podstawie uzyskanych danych wykazano, iż podczas eksperymentów prowadzonych przez 7 dni składniki biogenne nie są wyczerpywane i nie limitują wzrostu mikroglonów (Sylwestrzak 2016). W celu rozpoznania reakcji zbiorowisk mikrofitobentosu na wybrane substancje chemiczne (**ARTYKUŁ 1, 2, 3**) zastosowano stężenia związków ustalone na podstawie wartości koncentracji, które są określane jako zagrażające środowisku (na podstawie norm np. Dz.U.2011.257.1545 lub literatury przedmiotu, tj. Kulacki i Lamberti, 2008; Liu i in., 2015; Skeff i in., 2015) oraz wartości, których realny wpływ na mikroorganizmy roślinne obserwowano w trakcie wcześniejszych badań wstępnych (Sylwestrzak 2012; Sylwestrzak i Pniewski 2014; Sylwestrzak i Zgrundo 2014; Serwatka i in. 2015; Sylwestrzak i in. 2015a, 2015b). W testach zastosowano następujące stężenia: dla chlorku miedzi (II) - $2 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ i $2 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, dla glifosatu - $0,042 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,85 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ i $8,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz dla cieczy jonowej [BMIM]Cl - $1,13 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ i $1,75 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. W badaniach zaprezentowanych w **4 ARTYKULE** zakres zastosowanych temperatur wybrano na podstawie pomiarów prowadzonych na południowym Bałtyku w ostatnich latach (<http://www.satbaltyk.pl>) oraz na podstawie publikacji opisujących zjawisko krótkookresowych wzrostów temperatury, które mogą mieć duży wpływ na skład i strukturę zbiorowisk (Siegel i in. 2006; Bradtke i in. 2010; Rak i Wieczorek 2012; Stramska i Białogrodzka 2015).

Każdy wariant doświadczeń opisywanych w **ARTYKUŁACH 1, 2, 3 i 4** wykonywano w 3 powtórzeniach, jednak inne metody obserwacji reakcji zbiorowisk mikrofitobentosu na działanie czynnika pochodzenia antropogenicznego zastosowano w **ARTYKUŁACH 1, 2 i 3**, a inne w **ARTYKULE 4**. Do analizy wpływu czynników uznawanych jako zanieczyszczenia chemiczne wykorzystywano materiał, który stanowiły zbiorowiska mikrofitobentosu konserwowane płynem Lugola, a obserwacje przeprowadzono dla próbek zebranych po trzech i siedmiu dniach (**ARTYKUŁ 1 i 2, 3**). Analizę jakościową i ilościową zbiorowisk oraz analizę kondycji chloroplastów wykonano w 50 polach widzenia w komorach sedymentacyjnych Utermöhl (2 ml) pod mikroskopem ze światłem odwróconym Nikon Eclipse TS100 przy

powiększeniach x200, x400. Kondycję komórek wyznaczano na podstawie stanu chloroplastów grupując je w dwóch kategoriach: komórki z chloroplastami o prawidłowym kształcie (zgodne z kształtami przedstawianymi w publikacjach jako typowe i prawidłowe dla danych taksonów) oraz komórki z chloroplastami o nieprawidłowym kształcie (wykazujące odstępstwa od prezentowanych w literaturze przedmiotu). Wyniki eksperymentów przedstawiano jako liczebność wszystkich organizmów i przedstawicieli poszczególnych taksonów w odniesieniu do liczebności obserwowanej w roztworze kontrolnym zgodnie z zasadami przyjętymi w wytycznych OECD stosowanych do oceny wpływu toksyczności związków chemicznych na mikroorganizmy roślinne (OECD 2006).

Analizę wpływu krótkookresowego wzrostu temperatury (**ARTYKUŁ 4**) przeprowadzono na materiale zebrany jak w przypadku **ARTYKUŁÓW 1, 2 i 3**, jednak z zastosowaniem specjalnej preparatyki laboratoryjnej mającej na celu uzyskanie czystego materiału okrzemkowego, co wiąże się z usunięciem pozostałych organizmów wchodzących w skład mikrofitobentosu. Obserwację w preparatach stałych wykonanych z zastosowaniem żywicy Naphrax o współczynniku załamania światła $\sim 1,7$ przeprowadzono pod mikroskopem świetlnym Nikon 80i wyposażonym w kamerę DS-U2 przy powiększeniu x1000. W tym przypadku identyfikowano i zliczano do 300 okryw okrzemek. W trakcie testu związanego z krótkookresowym wzrostem temperatury analizowano także inne parametry, takie jak: aktywność fotosyntetyczna (określana za pomocą zmian fluorescencji chlorofilu *a* mierzonych z zastosowaniem fluorymetru Fluorescence Monitoring System (FMS1; Hansatech, Norfolk, UK)) oraz koncentracja barwników fotosyntetycznych (analiza jakościowa i ilościowa barwników została wykonana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z wykorzystaniem systemu Waters wyposażonego w dwie pompy Waters 515 oraz detektor fotodiodowy Waters 2998 Photodiode Array Detector). Szczegółową metodykę wykonanych analiz przedstawiono w publikacji. Ze względu na niezbędną spójność tematyczną niniejszej dysertacji w dalszej części tekstu uwzględniono wyniki związane z reakcją okrzemek na podwyższenie temperatury tylko w odniesieniu do składu i struktury zbiorowiska.

Jednym z podstawowych elementów analizowanych w doświadczeniach była całkowita liczebność zbiorowisk mikrofitobentosu. W przypadku chlorku miedzi (II) (**ARTYKUŁ 1**) i glifosatu w postaci preparatu Roundup® (**ARTYKUŁ 2**) w testowanych roztworach całkowita liczebność zbiorowisk pozostawała na podobnym poziomie podczas całego okresu badań. Zmiany dotyczyły jedynie struktury zbiorowisk czyli liczebności przedstawicieli poszczególnych taksonów mikroglonów. Zaobserwowano, że taksony wrażliwe na działanie

zastosowanej substancji zastąpione zostały taksonami tolerancyjnymi lub odpornymi, co doprowadziło do zmiany struktury zbiorowiska. Odmienną reakcję obserwowano w przypadku zbiorowisk poddanych działaniu cieczy jonowej [BMIM]Cl, gdzie większość taksonów wchodzących w skład badanego zbiorowiska reagowała zmniejszeniem liczebności komórek (**ARTYKUŁ 3**). W przypadku krótkookresowego wzrostu temperatury całkowita liczebność zbiorowisk była praktycznie stała, a jedynie zmieniały się udziały procentowe poszczególnych taksonów w całkowitej liczebności zbiorowisk (**ARTYKUŁ 4**).

Wśród gatunków dominujących, obecnych w wyjściowych zbiorowiskach, a także występujących we wszystkich eksperymentach wyróżniono głównie okrzemki, m. in.: *Bacillaria paxillifera* (O.F.Müller) T.Marsson, *Diatoma moniliformis* (Kützing) D.M.Williams, *Diatoma vulgaris* Bory, *Melosira nummuloides* C.Agardh, *Navicula perminuta* Grunow, *Tabularia fasciculata* (C.Agardh) D.M.Williams i Round. Najliczniej obserwowaną sinicą był takson *Merismopedia* sp. Meyen. Niezależnie od stopnia dominacji w zbiorowisku wyjściowym poszczególne taksony wykazały różny typ odpowiedzi na obecność czynnika pochodzenia antropogenicznego. Stąd wyróżniono między innymi grupę organizmów stymulowanych do wzrostu w obecności testowanych czynników. Przykładem gatunku, na który stymulujący wpływ miały wszystkie testowane czynniki była *N. perminuta*. Na przykład pod wpływem cieczy jonowej wykazała dwukrotne zwiększenie liczebności komórek zarówno pod wpływem chlorku miedzi jak i podwyższonej temperatury (**ARTYKUŁ 1 i 4**) oraz ośmiokrotne zwiększenie liczebności w obecności glifosatu (**ARTYKUŁ 2**) a także dziesięciokrotne zwiększenie liczebności w obecności cieczy jonowej [BMIM]Cl w stosunku do roztworu kontrolnego (**ARTYKUŁ 3**). Niektóre taksony były stymulowane obecnością substancji chemicznych jedynie w początkowej fazie testów. Na przykład liczba komórek *Achnanthes brevipes* C.Agardh w stężeniu $2 \cdot 10^{-5}$ g·dm⁻³ chlorku miedzi (II) zwiększyła się o 35% w trzeciej dobie, a w siódmej obserwowano już o 40% mniej komórek niż w roztworze kontrolnym. Niezwykle duży, aż czterokrotny, wzrost liczebności pod wpływem chlorku miedzi obserwowano u *Grammatophora marina* (Lyngbye) Kützing w stężeniu $2 \cdot 10^{-3}$ g·dm⁻³ CuCl₂ w trzeciej dobie (**ARTYKUŁ 1**). Część taksonów reagowała na obecność substancji chemicznych w ostatniej fazie testów. Na przykład u *Navicula ramosissima* (C.Agardh) Cleve w siódmej dobie testów obserwowano siedmiokrotnie więcej komórek niż w roztworze kontrolnym. (**ARTYKUŁ 3**). Glifosat wpływał na zwiększenie liczebności komórek *T. fasciculata* o 40% w stosunku do roztworu kontrolnego w stężeniu 8,5 g·dm⁻³ w siódmej dobie. Liczebność przedstawicieli sinic, tj. *Merismopedia* sp. i *Spirulina* sp. Turpin ex Gomont, uległa

wielokrotnemu zwiększeniu podczas trwania testów (odpowiednio o 416% i 1750%). Dzięki obecności glifosatu prawdopodobnie doszło do wzbogacenia medium hodowlanego w fosforowe związki biogenne (Delpy i in. 2022), co prowadziło do całkowitej przebudowy i zdominowania zbiorowiska mikrofitobentosu przez sinice (**ARTYKUŁ 2**).

Wśród taksonów zidentyfikowanych jako obojętne na działanie czynników pochodzenia antropogenicznego, w przypadku chlorku miedzi (II), wyróżniono np.: *Brebissonia lanceolata* (C.Agardh) R.K.Mahoney i Reimer, *Cocconeis pediculus* Ehrenberg, *Fallacia* sp. Stickle i D.G.Mann oraz *Rhoicosphenia abbreviata* (C.Agardh) Lange-Bertalot (**ARTYKUŁ 1**). Z kolei glifosat w testowanych stężeniach nie wpływał na zmiany w liczebności m.in. u: *Halamphora coffeaeformis* (C.Agardh) Levkov, *T. fasciculata* (**ARTYKUŁ 2**). W przypadku cieczy jonowej i krótkookresowego nagłego wzrostu temperatury niemal nie obserwowano gatunków określanych jako obojętne w stosunku do zastosowanych czynników (**ARTYKUŁ 3, 4**).

W testowanych zbiorowiskach zidentyfikowano wiele taksonów wrażliwych na działanie czynników pochodzenia antropogenicznego. Organizmami które reagowały zmniejszeniem liczebności na obecność zarówno chlorku miedzi jak i cieczy jonowej były m.in.: *B. paxillifera* i *T. fasciculata* (**ARTYKUŁ 1 i 3**). Okrzemka *M. nummuloides* była gatunkiem wykazującym szczególną wrażliwość na zastosowane substancje chemiczne, np. jej liczebność pod wpływem glifosatu zmniejszyła się do zaledwie 15% w stosunku do liczebności w próbie kontrolnej (**ARTYKUŁ 2**). Podobne reakcje obserwowano u *A. brevipes* i *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann, których komórek nie obserwowano w glifosacie i w cieczy jonowej w siódmej dobie testów. Negatywne skutki obecności chlorku miedzi (II) w medium hodowlanym obserwowano także w przypadku przedstawicieli sinic, np. u *Spirulina* sp. obserwowano zmniejszenie liczebności w stosunku do roztworu kontrolnego o około 40% (**ARTYKUŁ 1**). Wśród gatunków wrażliwych na krótkookresowy wzrost temperatury wyróżniono *G. marina*, której liczebność zmniejszyła się o 43% w ostatnim dniu testów w stosunku do próby kontrolnej (**ARTYKUŁ 4**).

Stan chloroplastów określany poprzez zmianę w kształcie i strukturze to dodatkowy wskaźnik uzupełniający informację o kondycji komórek organizmów wchodzących w skład zbiorowisk wykorzystanych w eksperymentach. Uzyskane wyniki wskazują, że liczba komórek poszczególnych taksonów może pozostawać na podobnym poziomie lub wzrastać w krótkich okresach czasu pomimo znacznego upośledzenia funkcji chloroplastów wywołanego

działaniem np. chlorku miedzi (II). Zmiany w kształcie i strukturze chloroplastów w obecności chlorku miedzi (II) i cieczy jonowej obserwowano u dominującego gatunku, tj. okrzemki *T. fasciculata* (ARTYKUŁ 1 i 3), podczas gdy pod wpływem glifosatu zmiany w kształcie i strukturze chloroplastów obserwowano u *B. paxillifera* (ARTYKUŁ 2). Dzięki obserwacji chloroplastów można lepiej poznać reakcję taksonów wchodzących w skład zbiorowisk na zastosowane czynniki chemiczne, jednak nie może być on stosowany jako samodzielny wskaźnik zmian zachodzących w zbiorowiskach.

Przeprowadzone w ramach realizacji pracy doktorskiej badania pozwoliły na potwierdzenie hipotezy badawczej poprzez zaobserwowanie zmian w składzie i strukturze zbiorowisk morskiego mikrofitobentosu zachodzących pod wpływem czynników związanych z działalnością człowieka, takich jak: wprowadzenie substancji chemicznych do środowiska czy krótkookresowe wzrosty temperatury. Zbiorowiska mikrofitobentosu charakteryzują się większą odpornością niż pojedyncze szczepy mikroglonów, u których obserwowano zmniejszenie liczebności pod wpływem zastosowanych czynników pochodzenia antropogenicznego już na wczesnych etapach testów (Sylwestrzak i in. 2014b). Ustępowanie taksonów wrażliwych i zastępowanie ich odpornymi wskazuje na fakt dużej wytrzymałości zbiorowisk jako funkcjonalnej całości na zaburzenia pochodzenia antropogenicznego. Badania oparte na rozmaitych organizmach tworzących mikrofitobentos pozwalają poznać bogactwo reakcji zarówno na poziomie komórkowym (np. poprzez ocenę stanu chloroplastów) jak i populacyjnym (analiza składu i struktury zbiorowisk). Okrzemka *N. perminuta* wykazała szczególną odporność na stosunkowo szerokie spektrum zanieczyszczeń chemicznych z jednej strony, a z drugiej elastycznie przystosowała się do krótkookresowego wzrostu temperatury. Jednak przeważająca część organizmów tworzących zbiorowiska mikrofitobentosu była wrażliwa na testowane substancje pochodzenia antropogenicznego. Uwagę zwraca fakt, że zwiększona koncentracja testowanych substancji chemicznych czy wzrost temperatury sprzyjał masowemu rozwojowi jedynie pojedynczych taksonów (np. *G. marina*, *N. perminuta*) lub grup taksonów (np. sinic w przypadku glifosatu).

Organizmy fotosyntetyzujące tworzące mikrofitobentos są niezwykle istotnymi elementami ekosystemów wodnych ze względu m.in. na ich rolę jako pierwotnych producentów. Poznanie i opisanie reakcji całych zbiorowisk jest niezwykle cenne, ponieważ umożliwia wiarygodnie oszacować zmiany, które mogą wystąpić pod wpływem czynników pochodzenia antropogenicznego w odniesieniu do każdego taksonu wchodzącego w ich skład. Wartościowym elementem pracy doktorskiej jest testowanie różnych czynników chemicznych

w oparciu o jedną metodykę co umożliwiło wyraźne prześledzenie różnych typów reakcji w odniesieniu do zbiorowisk i populacji mikroorganizmów. W skład mikrofitobentosu bałtyckiego wchodzi wiele taksonów i gatunków kosmopolitycznych co pozwala przypuszczać, że podobne reakcje na wpływ testowanych czynników, przedstawione w artykułach stanowiących podstawę dysertacji, wykażą zbiorowiska występujące w wodach brakicznych w innych rejonach świata. Wykorzystanie zbiorowisk mikrofitobentosu pozwala uzyskać bardziej wiarygodne informacje na temat prawdopodobnych zmian, które pojawią się w środowisku w wyniku działalności człowieka, niż testy prowadzone na pojedynczych szczepach mikroglonów. *Uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej wyniki dają nowe spojrzenie na funkcjonowanie zbiorowisk mikrofitobentosu w warunkach silnego stresu wywołanego czynnikami pochodzenia antropogenicznego jak i wzbogacają wiedzę na temat możliwości wykorzystania zbiorowisk mikroorganizmów w ekotoksykologii.*