

Dr hab. Roman Marks, prof. US
Instytut Nauk o Morzu i Środowisku
Uniwersytet Szczeciński
Ul. A. Mickiewicza 18
70-383 Szczecin

Szczecin, dn. 2.08.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi A. Wiśniewskiej

1. Uwagi ogólne

Pani mgr **Kinga Areta Wiśniewska** przedłożyła rozprawę doktorską w formie czterech prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych pod ogólnym tytułem: „Cyanobacteria and microalgae in the atmospheric aerosols in the coastal zone of the Gulf of Gdańsk”. Rozprawa powstała pod opieką Pani dr hab. Anity Lewandowskiej, prof. UG w Zakładzie Chemii Morza i Ochrony Środowiska Morskiego, Instytutu Oceanografii UG. Na rozprawę składają się tematycznie spójne artykuły naukowe uprzednio opublikowane w recenzowanych czasopismach w języku angielskim. Całość rozprawy liczy 107 stron i dodatkowo zawiera uzasadnienie problemu badawczego, prezentację zadań badawczych, informację o metodach badania próbek aerozoli oraz zastosowanych technikach i metodach analitycznych, a także prezentację wyników wraz z ich interpretacją. W skład rozprawy wchodzi cztery następujące prace:

1. K Wiśniewska, AU Lewandowska, S Śliwińska-Wilczewska, 2019.
The importance of cyanobacteria and microalgae present in aerosols to human health and the environment—Review study, *Environment International* 131, 104964;
2. K Wiśniewska, S Śliwińska-Wilczewska, M Savoie, AU Lewandowska, 2022,
Quantitative and qualitative variability of airborne cyanobacteria and microalgae and their toxins in the coastal zone of the Baltic Sea
Science of The Total Environment 826, 154152;
3. KA Wiśniewska, S Śliwińska-Wilczewska, AU Lewandowska, 2022,
Airborne microalgal and cyanobacterial diversity and composition during rain events in the southern Baltic Sea region
Scientific Reports 12 (1), 2029;
4. KA Wiśniewska, AU Lewandowska, S Śliwińska-Wilczewska, 2022,
The Ability of Airborne Microalgae and Cyanobacteria to Survive and Transfer the Carcinogenic Benzo (a) pyrene in Coastal Regions
Cells 12 (7), 1073.

W wymienionych artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem, a czasopisma mają zasięg międzynarodowy. Oszacowany łączny parametr IF dla tego zbioru prac wynosi 36, 668 (według punktacji MNiSW 620). Wskaźniki te sugerują, że publikacje mają szansę odegrać istotną rolę wytyczającą dalszy rozwój badań nad obecnością bioaerozoli i zanieczyszczeń powietrza oraz szerszych poszukiwaniach związków pomiędzy procesami meteorologicznymi, koncentracjami aerozoli i ogólną toksycznością zanieczyszczeń rozpraszanych w powietrzu. Dodatkowo, oświadczenia współautorów tych publikacji pozwalają jednoznacznie ocenić własny wkład Doktorantki, jako wiodący.

2. Ocena wyboru tematu badań

Badania eksperymentalne bioaerozoli wymagają jednoczesnego opanowania wiedzy i technik pomiarowych stosowanych w biologii, chemii, fizyce i meteorologii, dlatego też są bardzo wymagające. Zwykle niewidoczne gołym okiem kropelki aerozoli morskich wraz z agregatami pochodzenia organicznego, po rozproszeniu w powietrzu podlegają szybkiemu parowaniu wody, w ten sposób dostosowując się do wilgotności otaczającego powietrza. Wpływa to na zmniejszenie ich rozmiarów i masy, co ogranicza ich sedymentację i wydłuża czas ich transportu w powietrzu. Jednocześnie jednak wykazują one zdolności higroskopijne, co przekłada się na wilgotnościowe zwiększanie się ich masy. Mogą też podlegać agregacji z innymi aerozolami, co w konsekwencji zwiększa ich grawitacyjne wypadanie. Inną, dotąd słabo poznaną cechą bioaerozoli jest ich ładunek elektryczny, a zwłaszcza znak i wartość ładunku elektrycznego, który występuje w membranach na zewnątrz żywych komórek. Dodatkowo, bioaerozole pochłaniają promieniowanie słoneczne, które może prowadzić do ich destrukcji. W przypadku badań bioaerozoli, wszystkie tu wymienione, ale i też inne, ciągle słabo rozpoznane elementy, występują jednocześnie sprawiając, że badania bioaerozoli należą do szczególnie trudnych i dlatego są też mało popularne.

Sytuacja ta ewidentnie zmieniła się w wyniku pandemii Covid-19, gdy boleśnie uświadomiliśmy sobie, że gromadzenie wiedzy o bioaerozolach jest ważą i pilną potrzebą. Dlatego też, uwzględniając tylko ten aspekt należy uznać, że wybrana tematyka badawcza i pozyskane dane empiryczne są szczególnie cenne. Należy tu dodać, że jeszcze kilka lat temu, nic nie wiedzieliśmy o sinicach i mikro-qlonach, czy też okrzemkach występujących w aerozolach morskich.

Przy okazji obrony tej rozprawy warto wspomnieć, że badania aerozoli morskich i bioaerozoli zapoczątkował zespół profesora D.C. Blancharda w USA, a pierwsza publikacja donosząca o pęcherzykowej emisji bakterii do powietrza pochodzi z roku 1979. Dodać też trzeba, że w Polsce badania aerozoli morskich i morygenicznych występujących w formie kropel i kryształków soli zainicjował Pan Profesor Czesław Garbalewski.

3. Ocena publikacji nr 1

Pierwsza wybrana do zbioru publikacja pochodzi z roku 2019 ma charakter przeglądowy. Donosi zarówno o badaniach bioaerozoli, metodach pomiarowych jak i obserwacjach potwierdzających obecność sinic i mikro-qlonów w aerozolach nad akwenami morskimi oraz lądem. W pracy tej ogólnie omówiono też mechanizmy emisji bioaerozoli morskich do powietrza oraz wpływ czynników meteorologicznych na generację aerozoli. Autorzy omawiają też rozkłady rozmiarów komórek sinic i mikro-qlonów, a także ich potencjalny transport nad lądami. Istotną częścią tego opracowania jest wskazanie na potencjalny wpływ mikroorganizmów rozproszonych w aerozolach na zdrowie ludzi oraz zwierząt.

Publikacja ta kończy się listą rekomendacji wytyczających cele dalszych badań, które realizowano w później podjętych pomiarach i obserwacjach eksperymentalnych, a tym samym w kolejno powstających publikacjach. W pracy tej odnaleźć można obszerną listę odnośników do literatury przedmiotu badań, co wskazuje, że Doktorantka już na tym etapie zbudowała solidny fundament, który pozwolił jej na prowadzenie tak bardzo złożonego projektu pomiarowego.

4. Ocena publikacji nr 2

Publikacja ta prezentuje już pierwsze własne wyniki badań i dane pomiarowe pozwalające na tak ilościowe jak i jakościowe określenie zmian koncentracji sinic oraz mikro-qlonów w aerozolach morskich. Próby aerozoli pobierano z platformy posadowionej na dachu bu-

dynku w Gdyni, w odległości 1 km od brzegu Zatoki Gdańskiej, na wysokości około 20 m n.p.m. Próbkowanie aerozoli odbywało się przynajmniej cztery razy w miesiącu przez cały rok 2020. Wykonano 296 pomiarów podczas dnia i 276 obserwacji w nocy. Do poboru bioaerozoli zastosowano specjalny typ impaktora posiadającego 6-kaskad rozdzielających wielkości cząstek w sposób odzwierciedlający kaskadową penetrację aerozoli w układzie oddechowym człowieka. Próby bioaerozoli gromadzono bezpośrednio w szalkach Petriego, na sterylnym podłożu, co umożliwiło przeniesienie takich prób do inkubatora. Wybór tej metody pozwolił uporać się z wieloma mankamentami związanymi z kontaminacją próbek, która występuje przy stosowaniu filtracji powietrza. Jeszcze trudniej jest zachować sterylność próbek przy stosowaniu klasycznych impaktorów, gdy cząstki aerozoli są wklejane bezpośrednio na płytki mikroskopowe manualnie mocowane na poszczególnych kaskadach.

W wyniku badań potwierdzono występowanie sinic i mikro-glonów w aerozolah nad Zatoką Gdańską w całym rocznym okresie pomiarów. Jednak najwyższe koncentracje żywych komórek sinic i mikro-glonów wystąpiły w ciepłym okresie roku, a zwłaszcza w lipcu. W aerozolah wyizolowano 29 taksonów, przy czym dominowały sinice, których częstość występowania w aerozolah przedstawiono graficznie. Dokonano również analizy zmienności dobowych i dokładniejszej analizy przebiegu sezonowych zmian koncentracji obu badanych grup mikroorganizmów w aerozolah.

Imponująca jest też bogata lista sprzętu pomiarowego oraz metod analitycznych wykorzystanych w badaniach. Samo opanowanie procedur analitycznych, w tym dwóch typów mikroskopów oraz cytometrii przepływowej, która wykorzystuje laser niebieski i czerwony budzi moje uznanie.

Bardzo interesującym wątkiem podjętym w tej pracy jest ocena rozmiarów cząstek pod kątem ich potencjalnej penetracji w drogach oddechowych człowieka. Okazało się że, niektóre z wyizolowanych gatunków mogą docierać nawet do najgłębszych obszarów układu oddechowego człowieka. Jednak, większość, około 70% rozproszonych w powietrzu sinic i mikro-glonów miała rozmiary większe od około 7 μm , co ogranicza ich penetrację i ewentualne osadzanie w głębiej położonych obszarach płuc.

Nowe i chyba najciekawsze wyniki badań dotyczą potencjalnej toksyczności tych organizmów określanej w oparciu o detekcję mikrocystyn-LR. W pracy wskazano jednak na konieczność podjęcia dodatkowych badań w tym zakresie. Zaznaczyć jednak trzeba, że badania takie balansują na granicy obecnych na rynku technik detekcji, dlatego są bardzo trudne to wykonania.

5. Ocena publikacji nr 3

Kolejnym elementem rozpoznania obiegu bioaerozoli w powietrzu jest próba ilościowej i jakościowej analizy zmian mikro-glonów i sinic w opadach deszczu, tak przed jak i po ich wystąpieniu. Badania te w mojej ocenie, były bez wątpienia najtrudniejszym wyzwaniem. Obserwacje w tym zakresie przeprowadzono w okresie od lipca do września 2019 r. w oparciu o platformę pomiarową posadowioną na dachu budynku Instytutu Oceanografii UG w Gdyni. Choć wydawać by się mogło, że pobór próbek deszczu jest stosunkowo prosty, to z własnych doświadczeń wiem, że eksperymenty prowadzone podczas deszczu są bardzo wymagające, a analiza danych oraz ich interpretacja są zagadnieniami niezwykle złożonymi.

Wyniki tej pracy są szczególnie cenne, jednak kwalifikuję je, jako wstępne z powodu stosunkowo krótkiego okresu pomiarowego, tj. tylko trzech miesięcy w roku 2019. Główny jednak mankament tego zbioru danych dotyczy miejsca obserwacji, które położone było zbyt daleko od linii brzegowej i na stosunkowo dużej wysokości 20 m od miejsca emisji tj. powierzchni wody morskiej lub też pokrytej wodą powierzchni lądu. Eliminuje to

udział kropeł rozbryzgów, które generowane są podczas deszczu w nieporównywalnie większych koncentracjach. Krople rozbryzgów są stale emitowane przez impakcję kropeł deszczu, zwłaszcza dużych kropeł i rozpraszane bezpośrednio nad powierzchnią wody do małych wysokości, najwyżej kilku m w zależności od siły wiatru i intensywności opadów (Marks 1990). Rozbryzgi pochodzą głównie z samej mikro-warstwy powierzchniowej, a ich skład ilościowy i jakościowy różni się od tego, który występuje pod powierzchnią w wodzie. Dlatego też przypuszczam, że dodatkowe badania składu ilościowego i jakościowego mikro-warstwy powierzchniowej mogłyby uzupełnić i wzbogacić uzyskane wyniki. Takie obserwacje można by prowadzić w przypadku posadowienia platformy badawczej blisko brzegu na dalbie lub na molo. Muszę jednak dodać, że taka logistyka utrudniłaby znacząco pobory prób i całą dalszą logistykę postępowania z bioaerozolem.

Podkreślić trzeba, że do analizy danych wykorzystano solidne zaplecze pomiarów meteorologicznych z sieci pomiarowej ARMAAG oraz modelu HYSPLIT udostępnianego przez NOAA z USA, który pozwala na odtwarzanie trajektorii transportu mas powietrza. Do analiz bioaerozoli wykorzystano systemy poboru prób i analiz uprzednio opanowane dla warunków bezdeszczowych, co było kluczowe, aby gromadzić wartościowe i wiarygodne dane obserwacyjne.

Ogólnie lektura tej publikacji sprawia wrażenie, że Doktorantka i Współautorzy stanęli w obliczu wyzwania, które było trudne do ogarnięcia. Stąd też w pracy tej pojawiło się kilka nieścisłości, które umknęły nie tylko Autorom ale i Recenzentom wydawniczym, a które wymieniam na końcu tego fragmentu recenzji. Nie stanowią one jednak przeszkody utrudniającej pełny i właściwy odbiór tej pracy.

Odnosińki do literatury

Marks, R., 1990: Preliminary investigations on the influence of rain on the production, concentration and vertical distribution of sea-salt aerosol. *J. Geophys. Res.*, 95, C12, 22,299-22,304.

Drobne sugestie dotyczące ewentualnej korekty tekstu

1. Strona 1, akapit 3

Wilgotność powietrza jest parametrem istotnym dla transportu bioaerozoli, a nie samego procesu emisji.

2. Strona 2, akapit 5

(Unfortunately, there is a reference...), powinno być (...there is not reference...)

6. Ocena publikacji nr 4

Opracowanie to opublikowane w 2023 roku, uznaję za szczególnie ambitne i nowatorskie. Poznanie procesów, które wynikają z jednoczesnego kontaktu cząstek wchodzących w skład bioaerozoli oraz gazowych zanieczyszczeń jest istotnym kierunkiem badań. Jednocześnie, wybór benzo(a)pirenu B(a)P, do takich badań uważam za bardzo uzasadniony. Eksperymenty te przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych w specjalnych zbiornikach termostatycznych pozwalających na jednoczesne badanie wpływu temperatury i zmiennej koncentracji zanieczyszczeń B(a)P. Na szczególne uznanie zasługuje stopień złożoności eksperymentów i opanowanie kolejnych nowych procedur prowadzenia takich badań. Wykonane obserwacje mają charakter bardzo nowatorski i świadczą o odwadze Doktorantki. Ogólnie, czytając tę publikację odniosłem wrażenie, że Doktorantka dobrze rozumie zagadnienia powiązane z toksycznością i czuje się w nich bardzo dobrze.

Ogrom przedsięwzięcia, z powodu konieczności jednoczesnego opanowania metod poboru próbek i różnych metod analitycznych oraz zwracanie uwagi na żywe i aktywne biologicznie mikroorganizmy, budzi uznanie. W wyniku eksperymentów udało się ustalić,

że mikro-glony, a szczególnie zielenice mają potencjał degradacji benzo(a)pirenu, co jest bardzo ciekawe i obiecujące. Publikacja ta dopiero odsłania potencjalne kierunki dalszych poszukiwań, a lista pytań, już stawianych przez samych Autorów, jest długa. Pozostaje mi życzyć Doktorantce wytrwałości i wsparcia wielu przychylnych osób, które razem pracują w Instytucie Oceanografii na Uniwersytecie Gdańskim.

7. Uwagi krytyczne i rekomendacje dalszych badań

W publikacji pierwszej Doktorantka opisuje mechanizmy emisji kropeł aerozoli z morza do powietrza, jednak pominęła, lub też sceptycznie oceniła, propozycję generacji wirów kationowych pod pęcherzykami i elektro-dynamicznego mechanizmu wychwytywania komórek biologicznych, które gromadzą ujemny ładunek elektryczny na zewnątrz swoich membran (opisany w pracy Marks i inni z 2019 roku). Praca ta jest wprawdzie dwukrotnie cytowana przez Doktorantkę, ale w zbiorze recenzowanych publikacji nie ma wzmianek o tym najważniejszym mechanizmie, tworzenia się wirów kationowych pod pęcherzykami i emisji dużych kropeł wirowych, które to są wstrzykiwane do powietrza wraz z ładunkiem komórek biologicznych.

Ostatnio publikowane badania sugerują, że pęcherzykowa tj. (wirowo-elektryczna) selekcja i kondensacja pierwiastków, jonów oraz molekuł w wodzie morskiej jest istotnym procesem, który ma potencjał do generowania polimerów RNA i DNA, czyli tworzenia makromolekuł wirusów. Później, takie kationowe krople z RNA i DNA zawieszona w przestrzeni dodatniego ładunku elektrycznego troposfery mogą tworzyć agregaty sferyczne o budowie typowej dla korona-wirusów i bakterii (Marks 2022).

Dodatkowo, sądzę, że wyniki badań eksperymentalnych, jakie stanowią najistotniejszą wartość przedłożonej rozprawy, są jednak obciążone wyborem miejsca badań. Śpieszę jednak dodać, że biorąc pod uwagę złożoność procedur i logistykę poboru prób, uznaję wybór miejsca pomiarowego na dachu budynku Instytutu Oceanografii w Gdyni, na wysokości 20 m w odległości 1 km od morza, za rozsądny. Jednak należy podkreślić, że lepszym miejscem próbkowania bioaerozoli byłaby lokalizacja przy brzegu, a idealnym przeprowadzenie badań na statku lub innej platformie położonej bezpośrednio na morzu.

Uzupełniającym, ale ważnym elementem rozpoznania byłoby też eksperymentalnie ustalenie wartości współczynników wzbogacania komórek sinic i mikro-glonów w kroplach emitowanych przez pękające pęcherzyki, tak jak to opisano dla okrzemek w pracy (Marks i inni 2019). W tej pracy powiązано różny ładunek elektryczny, jaki występuje pomiędzy wirami kationowymi ciągnionymi pod pęcherzykami i ujemnymi ładunkami gromadzonymi w membranach na zewnątrz komórek. Stąd też moje pytanie, czy można by wykonać takie eksperymenty wybierając, np. dwa hodowane w laboratorium różne taksony sinic i kolejne dwa mikro-glonów?

Kolejne pytanie dotyczy rozkładu ładunków elektrycznych w komórkach sinic i mikro-glonów? Czy takiej wiedzy jeszcze po prostu nie ma?

Odniesienia do literatury

Marks R, Górecka E, McCartney K, Borkowski W (2019) Rising bubbles as mechanism for scavenging and aerosolization of diatoms. *J Aerosol Science*, Vol. 128, 79-88

Marks R (2022) Bubble mediated polymerization of RNA and DNA. *AIMS Biophysics*, 9(2), 96-107, DOI: 10.3934/biophy.2022009

8. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Wiśniewskiej powstała w wyniku kilkuletnich badań eksperymentalnych i jednocześnie dotyczy szczególnie aktualnych wyzwań, przed którymi

obecnie stoi nauka. Jednoczesne połączenie wiedzy biologicznej, fizycznej i chemicznej oraz sprostanie wymogom technicznym i organizacyjnym zasługuje na szczególne uznanie. W końcowej fazie badań Doktorantka podejmuje się nawet poszukiwania potencjalnych związków między obecnością mikroorganizmów, a degradacją wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, co wydaje się stawiać tę pracę w gronie bardzo odważnych przedsięwzięć eksperymentalnych. Podkreślenia wymaga też przemyślany dobór metod badawczych, który pozwolił na skuteczne prowadzenie złożonych eksperymentów oraz późniejsze poszukiwania współzależności i prawidłowości.

Do najważniejszych sukcesów tego zbioru prac należy zaliczyć pozyskanie danych eksperymentalnych wskazujących, że:

- 1) sinice i mikro-glony są obecne w powietrzu nad Zatoką Gdańską przez cały rok,
- 2) sinice i mikro-glony również występują w wodzie opadowej,
- 3) mikroorganizmy te mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia, zarówno jako bezpośrednie źródło toksyn jak i potencjalny nośnik benzo(a)pirenu.

W szczególności ustalono, że w powietrzu nad strefą brzegową Zatoki Gdańskiej, a tym samym nad akwenem Bałtyku Południowego:

- liczebność sinic i mikro-glonów w powietrzu waha się od 0 do 1685 komórek m^{-3} , a w wodzie opadowej zakres zmian wahał się od 100 do 342×10^3 komórek L^{-1} ,
- w składzie aerozoli i próbach deszczu wyizolowano 29 taksonów sinic i mikro-glonów, z czego większość tj. około 60% stanowiły sinice,
- w powietrzu występują też taksony produkowane przez sinice i mikro-glony, które to są potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia ludzi
- sinice i mikro-glony mogą być deponowane nawet w najgłębszych obszarach płuc, jednak większość tych organizmów około (70%) występuje, jako cząsteczki o średnicach większych od 7 μm , które są mniej niebezpiecznych dla zdrowia.

Istotne jest też wskazanie, że sinice są zdolne do produkowania mikrocystyny - LR, a jej stężenia wahają się od poziomu poniżej limitu detekcji nawet do około 420 $fg\ kom.^{-1}$.

Nieco zaskakujące jest to, że niskie stężenie B(a)P może prowadzić do wzrostu liczby komórek sinic i mikro-glonów w powietrzu, a w konsekwencji do zmian zawartości barwników asymilacyjnych i zdolności do przeprowadzania procesu fotosyntezy. Jednak najciekawsze jest ustalenie, że obecne w powietrzu zielenice mogą sprzyjać degradacji benzo(a)pirenu.

9. Podsumowanie

Biorąc pod uwagę unikalną wartość publikacji przedłożonych jako rozprawa doktorska uważam, że spełnione są wymogi formalne określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym, z dnia 20 lipca 2018 r. i składam do Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Kingi A. Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

10. Wniosek o wyróżnienie rozprawy

Biorąc pod uwagę wieloaspektowość i poziom trudności wykonanych badań oraz szerokie spektrum zastosowanych metod badawczych pochodzących z różnych dziedzin wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi A. Wiśniewskiej.

Roman Małach