

Dr hab. Grzegorz Orłowski, prof. nadzw.
Instytut Środowiska Rolniczego i Leśnego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Bukowska 19
60-809 Poznań
e-mail: orlog@poczta.onet.pl
tel. 668 858 562

Uniwersytet Wrocławski Wydział Nauk Biologicznych (3)		
Wpłynęło do WNB	02-01-2020	Załączniki
Wpł. do jedn. org.	Data	Symbol
Znak sprawy		

16 grudnia 2019

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Kolendy

pt.: „Śmiertelność ropuchy szarej *Bufo bufo* na drogach podczas wiosennych migracji oraz wykorzystanie martwych osobników w badaniach populacyjnych”
wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Marii Ogielskiej w Zakładzie Biologii Ewolucyjnej i Ochrony Kręgowców Uniwersytetu Wrocławskiego

Jak słusznie podkreśla w swojej rozprawie doktorskiej Pan mgr Krzysztof Kolenda płazy należą do najbardziej narażonych na wyginięcie kręgowców, a śmiertelność na drogach może być główną przyczyną ich wymierania szczególnie w silnie zurbanizowanych rejonach świata. Dramatyczna urbanizacja, rozrost sieci drogowej i wzrost natężenia ruchu kołowego jaki ma miejsce współcześnie w wielu rejonach świata, w tym w Europie i Polsce, implikuje pilną potrzebę intensyfikacji badań w niezwykle szybko rozwijającej się dyscyplinie naukowej określanej jako *ekologia dróg*. W pełni podzielam pogląd wyrażany w treści rozprawy przez Pana mgr Krzysztofa Kolendę, który powołując się na aktualne prace źródłowe stwierdza, że zagadnienia związane z wpływem ruchu kołowego na dziko żyjącą faunę, w tym na płazy pozostaje nierozwiązanym problemem w skali globalnej.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Krzysztofa Kolendy (ogółem 54 stron) obejmuje polskojęzyczne *Wprowadzenie* (15 stron), gdzie Autor syntetycznie omawia problematykę śmiertelności płazów na drogach, w kontekście struktury płci i wieku oraz zarysowuje problem potencjalnego wykorzystywania martwych płazów w badaniach deformacji tkanki kostnej i składu pokarmu. Jak czytamy we *Wprowadzeniu*, Autor sformułował cztery główne cele badawcze: (1) *określenie, czy zebrane z jezdni ropuchy mogą być wykorzystane do badań nad strukturą płci i wieku*; (2) *analiza deformacji tkanki kostnej martwych ropuch w zależności od stopnia urbanizacji wokół miejsc rozrodu*; (3) *porównanie struktury wieku martwych ropuch ginących na drogach ze strukturą wieku ropuch, które przeszły przez jezdnie i utworzyły populację rozrodczą*; (4) *sprawdzenie, czy wbrew powszechnemu przekonaniu, migrujące ropuchy żerują zaraz po wybudzeniu z odrętwienia zimowego, a jeśli tak, określenie jaki jest skład ich diety*.

Główną część rozprawy stanowią trzy wielo-autorskie artykuły naukowe opublikowane w latach 2016-2019 w czasopismach indeksowanych w *Web of Science*:

(1) Phalangeal bone anomalies in the European common toad *Bufo bufo* from polluted environments. Mikołaj Kaczmarski, Krzysztof Kolenda, Beata Rozenblut-Kościsty, Wioletta Sośnicka. *Environmental Sciences and Pollution Research* (2016) 23:21940–21946.

(2) Road-killed toads as a non-invasive source to study age structure of spring migrating population. Krzysztof Kolenda, Mikołaj Kaczmarski, Anna Najbar, Beata Rozenblut-Kościsty, Magdalena Chmielewska, Bartłomiej Najbar. *European Journal of Wildlife Research* (2019) 65: 5.

(3) Road-killed toads as a non-invasive source to study feeding ecology of migrating population. Krzysztof Kolenda, Natalia Kuśmierk, Marcin Kadej, Adrian Smolis, Maria Ogielska. *European Journal of Wildlife Research* (2019) 65: 55.

Według zamieszczonych informacji udział Pana mgr Krzysztofa Kolendy w powstaniu każdej z tych prac był znaczący i wynosił odpowiednio 50%, 60% i 70%. W mojej ocenie w pełni uzasadnia to wykorzystanie tych publikacji przez Doktoranta we własnej dysertacji.

W końcowej części rozprawy Autor syntetyzuje najważniejsze wyniki badań w rozdziale *Podsumowanie* (4 strony) zakończonym sformułowaniem najistotniejszych wniosków. Rozprawę kończą streszczenia w języku polskim i j. angielskim (po dwie strony każde).

Uważam, że trzy artykuły naukowe stanowiące dysertację Pana mgr Krzysztofa Kolendy stanowią ważny przyczynek do poznania wybranych zagadnień z zakresu biologii ekologii płazów. Szczególnie interesująca jest praca o składzie pokarmu ropuch. Jednak w mojej ocenie nie wszystkie wyniki badań zostały jednoznacznie udowodnione w oparciu o zgromadzony materiał analityczny, a w szczególności największe wątpliwości może budzić analiza materiału kostnego pobranego od martwych (rozjechanych) ropuch, w której pominięto potencjalny aspekt uszkodzeń szkieletu przez pojazdy. Wątpliwości budzą także drobne niedociągnięcia czy błędy językowe, głównie o charakterze formalnym w polskojęzycznej części rozprawy, a w mniejszym stopniu także w opublikowanych artykułach. Poniżej omawiam szczegółowo kwestie zawarte w rozprawie budzące największe wątpliwości. Ostatecznie jednak, przyjmując, że podstawę dysertacji stanowią opublikowane już artykuły naukowe, wymienione poniżej uwagi należy traktować jako zalecenia dla Autora rozprawy (i współautorów jego artykułów naukowych), do dalszych bardziej wnikliwych analiz i poprawy jakości prezentacji wyników badań.

Należy pochwalić Pana mgr Krzysztofa Kolendę, że już na etapie studiów doktoranckich samodzielnie realizował liczne projekty badawcze, które uwieńczone zostały publikacjami w

czasopismach indeksowanych w *Journal Citation Reports*. Co świadczy o dużym potencjale badawczym Doktoranta i jego predyspozycji do pracy naukowej.

UWAGI SZCZEGÓŁOWE

- Użyty przez Autora tytuł rozprawy nie jest adekwatny do treści zawartej w dysertacji, ze względu na brak jednej spójnej informacji (np. tabeli) podsumowującej liczbę ofiar na poszczególnych badanych odcinkach dróg (a także informacji o ich długościach, liczbie kontroli) użycie pierwszej części tytułu tj.: "Śmiertelność ropuchy szarej *Bufo bufo* na drogach podczas wiosennych migracji" jest nieuzasadnione i trudno jest dane z publikacji odnieść czy wykorzystać w kontekście samej śmiertelności na drogach. Bardziej adekwatnym tytułem mogłoby być użycie zwrotu przedstawionego w pierwszym zdaniu Podsumowania (str. 47): *Wykorzystanie martwych płazów ginących na drogach w badaniach nad wybranymi cechami populacji*.
- We Wprowadzeniu (dwa razy) i Streszczeniu (raz) Autor używa terminu *użytkowanie gruntów*, w kontekście wymierania płazów o wiele bardziej zasadnym byłoby użycie terminu *użytkowanie terenu = land cover*; ten poprawny termin użyto w pracy 1 i 2.
- Autor w mało zrozumiały sposób używa skrótów myślowych, np. zdanie na str. 5: *W swojej pracy doktorskiej skupiłem się na zaniku siedlisk, a w szczególności wpływie urbanizacji i rozbudowy dróg*. W mojej ocenie trudno jest treść rozprawy odnieść do tej problematyki.
- Zdanie na str. 6: *Jednym ze skutków zmian użytkowania gruntów jest rozbudowa sieci dróg, która prowadzi do fragmentacji środowiska i tym samym negatywnie oddziałuje na poszczególne grupy fauny i flory (Baxter-Gillbert i in. 2015; Ward i in. 2015; Ibisch i in. 2016)*. – należało by napisać, że rozbudowa sieci dróg jest jedną z najbardziej dramatycznych konsekwencji zmian użytkowania terenu (lub przekształceń środowiska).
- str. 7 i w pracy 1 (*Phalangeal bone anomalies in the European common toad...*) Autor pisze: *W przedstawionym cyklu prac przyjęto założenie, że bardzo dobrym źródłem materiału kostnego mogłyby stać się osobniki martwe. Pobranie od nich tkanek nie wymaga narażania zwierząt na stres związany z chwytaniem i amputacją palca. Jednakże, jak dotąd nie wiadomo, czy kości płazów ginących na drogach zachowują się w stanie na tyle dobrym by móc przeprowadzić*

analizę skeletochronologiczną. Z tym problemem badawczym związana jest bardzo ważna (lecz całkowicie pominięta w dysertacji) kwestia uszkodzeń szkieletu u ofiar kolizji drogowych. Wiadomo jest, że np. u ptaków ginących na drogach dochodzi często do złamań różnych kości. W przypadku rozjechanych na drogach płazów, należy spodziewać się jeszcze większych uszkodzeń kości/szkieletu. Czy Autor wyeliminował potencjalne uszkodzenia kości/szkieletu spowodowane przez pojazdy samochodowe? Na rysunku 3 (str. 10) i rysunku 2 (w pracy *Phalangeal bone anomalies in the European common toad...*) kształt przekroju trzonu kości jest nieco spłaszczony i pozbawiony jest substancji międzykomórkowej, co sugerować może zniszczenie tych struktur przez nacisk zewnętrzny, np. kół samochodowych. Ponieważ Autor wiąże stopień degradacji kości z poziomem (niezdefiniowanych bliżej) zanieczyszczeń, dlaczego do udowodnienia tych zależności nie użyto materiału pobranego od żywych ropuch? Czy zaobserwowano deformację tkanki kostnej paliczków popranych od żywych ropuch użytych w kolejnych badaniach (tj. *Road-killed toads as a non-invasive source to study age structure of spring migrating population*). Wydaje się, że aspekt deformacji struktur kości powinien być przedyskutowany w tej drugiej pracy także. Ponieważ rzeczywiście mogą istnieć różnice w strukturze kości w zależności od stopnia zanieczyszczenia środowiska (co byłoby ważnym wynikiem), namawiam silnie Autora do powtórzenia badań z użyciem tkanek pobranych od żywych ropuch. Z drugiej strony, należy założyć, że niektóre ropuchy mogą przeżyć kiedy koła pojazdu przejadą tylko po ich kończynach. Podobnie udowodniono, że ptaki żyjące w środowisku miejskim charakteryzuje wyższy odsetek samoistnie wygojonych złamań kości.

• na str. 9 i w pracy *Phalangeal bone anomalies in the European common toad* Autor pisze, że, *Porównanie struktury płci między stanowiskami wykazało, że ropuchy żyjące w siedlisku zurbanizowanym mają zaburzony stosunek liczby samic do samców tj. zwiększony udział tych pierwszych. Prawdopodobnie ma to związek z niską przeżywalnością samców w zanieczyszczonym środowisku (mniejsze osobniki łatwiej chłoną zanieczyszczenia)*. Nie jestem przekonany, że na podstawie jednorazowej czy nawet kilku kontroli możliwe jest ustalenie struktury płci, gdyż jak pisze sam Autor samce rozpoczynają wędrówkę wcześniej niż samice. Jak zatem kontrolowano wpływ sezonu na strukturę płci? Z punktu widzenia poprawności metodycznej o wiele bardziej zasadna byłaby ocena strukturę płci wśród ropuch, które dotarły już do zbiorników wodnych. Taki sam wniosek przedstawiają Autorzy na początku Dyskusji w drugiej pracy (*Road-killed toads as a non-invasive source to study age structure*), gdzie pojawia się następujące zdanie: *We would provide a stronger representative sample of the actual breeding population if the live toads were collected directly from breeding ponds.*

- na str. 11 i w pracy *Road-killed toads as a non-invasive source to study feeding ecology of migrating population*, Autor pisze, iż: *Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy samcami i samicami z lub bez pokarmu na obu stanowiskach oraz pomiędzy badanymi populacjami*. Szkoda, że Autorzy tej pracy nie przeanalizowali różnic w masie zdobyczy w kontekście wielkości samych ropuch. Jak widać z zamieszczonej tabeli masa ofiar ropuch (Supplementary material) różni się znacznie pomiędzy poszczególnymi taksonami, a dane o masie większości tych zdobyczy są łatwo dostępne w opublikowanych pracach. Inną moją sugestią, wartą rozważenia w kolejnych badaniach, jest sprawa obecności ziemi w układzie pokarmowym ropuch, czy możliwe jest, że pochodzi ona ze skonsumowanych dżdżownic. Jeśli tak jest to należałoby spodziewać się także obecności szczecinek dżdżownic.
- W pracy *Phalangeal bone anomalies in the European common toad* nie przedstawiono żadnych ilościowych charakterystyk w kontekście stężeń zanieczyszczeń (metale, pozostałości pestycydów etc.) uzasadniających użycie terminu "polluted environments".
- Dalej w tej samej pracy podane jest: *In the rural population, anomalies were found in 19 % of toads; in semi-urban, in 23 %; and in urban, in 82 % (Table 1)*. Jakie jest natężenie ruchu pojazdów na tych drogach? Czy ten wynik może odzwierciedlać stopień degradacji martwych ropuch przez większą liczbę pojazdów?
- W Dyskusji tej pracy pojawia się komentarz: *We found that the toad population from the urban site was prone to a greater extent to the formation of anomalies in bone tissue than those from the semi-urban and rural sites (Table 1). One of the factors may be the effect of the food base or hibernation site on the concentration of contaminants in the body. For instance, the common toad forage on earthworms and other invertebrates, which constitute a dangerous source of heavy metals for amphibians (Gish and Christensen 1973; Darling and Thomas 2005)*. – to wydaje się zaskakujące stwierdzenie, gdyż wśród zdobyczy ropuch stwierdzono tylko jedną dżdżownicę. Wskazane przeprowadzenie dalszych badań nad konsumpcją dżdżownic, jak zasugerowałem już wcześniej w tej recenzji.
- W Dyskusji tej pracy Autorzy błędnie użyli symbolu chemicznego dla siarki (S), Si to krzem (silicon): *Additionally, we found a relatively large proportion of individuals with abnormalities from the semi-urban and rural sites. In other agricultural site in Poland, high concentrations (11*

% of all elements) of sulphur (Si) were found in the shafts of abnormal bones, but a negligible amount (0.3 %) in tissue without malformations (unpublished data). As well, low concentrations of molybdenum (Mo) and aluminium (Al) were found only in the epiphyses of impaired bones. O jaki pierwiastek rzeczywiście tutaj chodzi?

- W pracy *Phalangeal bone anomalies in the European common toad* i *Road-killed toads as a non-invasive source to study age structure* Autorzy używają zwrotu *high concentration of anomalies*, to jest mylące szczególnie, iż równocześnie powoływane są kwestie zanieczyszczeń.
- W opisie metod statystycznych w trzeciej pracy (*Road-killed toads as a non-invasive source to study feeding ecology*) pojawia się zdanie: *We also compared the mean prey number caught by males and females at both localities using the Mann-Whitney U test. A statistical significance level of $p < 0.01$ was defined in order to avoid type I error due to multiple comparisons.* Zgodnie z zasadami statystyki dla dwóch porównań poziom P należało skorygować ewentualnie do $P = 0.025$; użycie wartości $P < 0.01$ jest ryzykowne, ale rozumiem, że pracy i tak podano oryginalne wartości istotności statystycznej.
- Szkoda, że w trzeciej pracy (*Road-killed toads as a non-invasive source to study feeding ecology*) nie przetestowano różnic w masie zdobyczy skonsumowanej przez samce i samice. Niejasne jest trzecie zdanie w rozdziale Results, czego dotyczy ten test: *There were no significant differences between males and females, with or without prey, in Wrocław (Fisher's exact test, $p = 1$) and Złoty Las ($p = 0.83$), or between individuals, with or without prey, between study sites ($p = 0.89$) (Table 1).*
- Ciekawym wątkiem jest kwestia trawienia zdobyczy. W Dyskusji trzeciej pracy (*Road-killed toads as a non-invasive source to study feeding ecology*) Autorzy piszą o tempie trawienia zdobyczy u płazów: *Although we found prey in the stomachs of only 39% of the collected toads, intestinal contents were present in 73%. As amphibians are capable of processing food during hibernation (Gossling et al. 1980; Jiang and Claussen 1993), we concluded that the intestinal contents were the remnants of recently consumed food, i.e. eaten after hibernation but before breeding.* Ale zastanawiające jest czy układzie pokarmowym ropuch może zalegać treść z poprzedniego sezonu jesiennego.

- Innym wyjaśnieniem dla wysokiego udziału fragmentów roślin, podobnie jak ziemi w układzie pokarmowym ropuch (*odpowiednio u 36 (15%) i 16 (6,5%) ropuch znaleziono fragmenty roślin oraz grudki ziemi*), może być wtórne pochodzenie z układu pokarmowego skonsumowanych ofiar.
- W kontekście zamieszczonych powyżej uwag nie wszystkie konkluzje wymienione w Podsumowaniu i Streszczeniu dysertacji zostały w pełni udowodnione. Wątpliwości budzi treść następujących zdań: *Ponadto wykazano, że ropuchy żyjące w środowisku zanieczyszczonym mają nieprawidłowo zbudowaną tkankę kostną, a liczba osobników z tymi deformacjami rośnie wraz z gradientem urbanizacyjnym. Oznacza to, że stan tkanki kostnej może być wskaźnikiem oceny stanu środowiska.* – a kwestia uszkodzeń szkieletu przez pojazdy.
- W drugiej publikacji (rozdział 3) potwierdzono brak różnic w strukturze wieku między ropuchami, które zginęły na drogach, a tymi którym udało się przejść na drugą stronę jezdni i mogły wejść w skład populacji rozrodczej. – nie badano populacji rozrodczej tylko jej część.
- W Podsumowaniu pojawia się stwierdzenie, że *Wyniki te świadczą o tym, że martwe ropuchy ginące na drogach mogą stanowić nieinwazyjną alternatywę do badań nad strukturą populacji i mogą być szeroko wykorzystywane w miejscach masowej śmiertelności płazów*, i na kolejnej stronie czytamy: *Przede wszystkim wykorzystanie martwych osobników ginących na drogach niweluje ból podczas pozyskiwania materiału od żywych osobników.* – zastanawia mnie czy w ogóle użycie terminu *badania nie-inwazyjne* w kontekście zabitych ropuch (dotyczy to także tytułów prac z tej rozprawy) jest poprawne od strony zarówno logicznej, jak i etycznej. Tą uwagę należy potraktować bardziej jako głos do dyskusji, ale zgodnie z ostatnią definicją pojęcia *non-invasive study* wykorzystywanie martwych zwierząt, w tym ofiar kolizji drogowych sklasyfikowane zostało do kategorii badań pośmiertnych (*post-lethal*) kręgowców (Pauli, J.N., Whiteman, J., Riley, M., Middleton, A. 2010. Defining noninvasive approaches for sampling of vertebrates. Conservation Biology 24: 349–352). Może warto rozważyć napisanie polemiki z tym problemem.
- W Podsumowaniu pojawia się stwierdzenie, że *Ponieważ ropuchy jednorazowo mogą zjeść pokarm o łącznej masie stanowiącej nawet 20% własnej masy ciała, oznacza to, że przy planowaniu badań nad kondycją oraz możliwościami reprodukcyjnymi gatunków o eksplozywnych godach, należy uwzględnić zawartość ich żołądków (w przeciwnym razie masa*

ciała może być znacząco zawyżona). – tu szczególnie widać, że samo podejście taksonomiczne do składu zdobyczy jest niewystarczające, i aż prosi się o uwzględnienie masy poszczególnych ofiar.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu stwierdzam, że wymienione niedociągnięcia i braki wskazane przeze mnie w niniejszej recenzji powinny zostać wyeliminowane w trakcie przygotowywania dalszych publikacji naukowych opartych na danych zawartych w przedłożonej rozprawie. Pan mgr Krzysztof Kolenda w przyszłości szczególnie nacisk powinien położyć na zdecydowane bardziej jednoznaczne definiowanie pojęcia *zanieczyszczenie środowiska* tzn. używać precyzyjnych terminów np. podając stężenia pierwiastków (metali) czy zanieczyszczeń organicznych, pamiętając jednak, że powszechnie uznawane za toksyczne tzw. *metale ciężkie* wchodzi w skład niemal każdego żywego organizmu, a poziom ich wykrywalność jest zależny od użytej aparatury pomiarowej.

Jestem przekonany, że praca doktorska Pana mgr Krzysztof Kolendy stanowi wystarczającą podstawę do ubiegania się o nadanie mu stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biologia. Stwierdzam, uwzględniając merytoryczną wartość ocenianej rozprawy, że spełnia ona wymogi określone *ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku*, stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora. Jednocześnie wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Krzysztofa Kolendę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Grzegorz Orłowski
Kierownik Zakładu Agroekologii i Bioindykacji
Instytut Środowiska Rolniczego i Leśnego PAN w Poznaniu