

Prof. dr hab. Lidia Wolska
Zakład Toksykologii Środowiska
Wydział Nauk o Zdrowiu
Gdański Uniwersytet Medyczny

OCENA

*rozprawy doktorskiej mgr **Lilianny SHARMA***

*pt.: „ The impact of mixtures of emerging contaminants on photoautotrophic
microorganisms of the Baltic Sea”*

*(Wpływ mieszanin nowo pojawiających się zanieczyszczeń na mikroorganizmy
fotoautotroficzne Morza Bałtyckiego)*

w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki o Ziemi i środowisku

Promotor: prof. dr hab. Ksenia Pazdro (Instytut Oceanografii PAN)

Promotor pomocniczy: dr. Grzegorz Siedlewicz (Instytut Oceanografii PAN)

1. Podstawa formalna oceny

Rada Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Instytutu Oceanologii PAN powołała mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr **Lilianny SHARMA** zatytułowanej: *The impact of mixtures of emerging contaminants on photoautotrophic microorganisms of the Baltic Sea* (Wpływ mieszanin nowo pojawiających się zanieczyszczeń na mikroorganizmy fotoautotroficzne Morza Bałtyckiego).

Po decyzji Rady Naukowej IO PAN na posiedzeniu 156 w dniu 09.06.2025, o wykonanie opinii zwróciła się w dniu 09.06.2025 prof. dr hab. Monika Kędra, Przewodnicząca Rady Naukowej IO PAN w Sopocie.

Promotorem pracy jest prof. dr hab. Ksenia Pazdro (Instytut Oceanografii PAN), promotorem pomocniczym dr. Grzegorz Siedlewicz.

Warunki stawiane rozprawom doktorskim zostały określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*.

2. Charakterystyka pracy i ocena formalna

W skład doktoratu wchodzi pięć publikacji wymienionych poniżej:

1. Sharma, L.*, Siedlewicz, G., Pazdro, K., 2021. The Toxic Effects of Antibiotics on Freshwater and Marine Photosynthetic Microorganisms: State of the Art. *Plants*, 10:591. <https://doi.org/10.3390/plants10030591> Impact factor (IF) in a given year: 4.6, 5-year IF: 4.4
2. Siedlewicz, G.*, Żak, A., Sharma, L., Kosakowska, A., Pazdro, K., 2020. Effects of oxytetracycline on growth and chlorophyll a fluorescence in green algae (*Chlorella vulgaris*), diatom (*Phaeodactylum tricornutum*) and cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa* and *Nodularia spumigena*). *Oceanologia* 62, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2019.12.002> Impact factor (IF) in a given year: 2.4 , 5-year IF: 2.6
3. Sharma, L.*, Kudłak, B., Siedlewicz, G., Pazdro, K., 2023. The effects of the IM1-12Br ionic liquid and the oxytetracycline mixture on selected marine and brackish microorganisms. *Sci Total Environ.* 25;901:165898. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165898> Impact factor (IF) in a given year: 8.2 , 5-year IF: 10.8
4. Sharma L.*, Kudłak, B., Stoń-Egiert, J., Siedlewicz, G., Pazdro, K., 2024. Impact of Emerging Pollutants Mixtures on Marine and Brackish Phytoplankton: diatom *Phaeodactylum tricornutum* and cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Sci Total Environ.* 10;955:177080. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177080>. Impact factor (IF) in a given year: 8.2, 5-year IF: 10.8 ii
5. Sharma, L.*, Kudłak, B., Stoń-Egiert, J., Siedlewicz, G., Pazdro, K., 2025. Effects of Emerging Pollutant Mixtures: Assessing the Impact of Caffeine and Ionic Liquid Combinations on Cyanobacteria and Diatom Species. *J Hazard Mater.* 491:138011. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.138011> Impact factor (IF) in a given year: 12.2 , 5-year IF: 11.9

Wszystkie publikacje są wieloautorskie. Pierwsza ma charakter pracy przeglądowej (ukazała się 21 marzec 2021), pozostałe cztery to publikacje o charakterze doświadczalnym (druga ukazała się 8 styczeń 2020, trzecia 30 lipiec 2023, czwarta, 29 październik 2024, piąta 21 marzec 2025). W czterech publikacjach, w tym publikacji przeglądowej, Dyplomantka jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, w jednej z nich (chronologicznie pierwszej opublikowanej pracy) jest trzecim autorem. Oświadczenia współautorów i Dyplomantki zgodnie wskazują na Jej wiodącą rolę w powstaniu koncepcji badań i ich wykonaniu.

Badania opublikowane są w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania IF, czasopismach cenionych w świecie naukowym (w kolejności publikowania: *Plants*, *Oceanologia*, *Sci Total Environ*, *Sci Total Environ*, *J Hazard Mater*)

Całkowity współczynnik oddziaływania IF: 35,6.

Zasadność podjęcia tematu badawczego.

Dynamiczny rozwój współczesnej cywilizacji, (dla którego początek określany jest na początek ery przemysłowej ok. 1850 rok) oparty jest na kreowaniu nowych materiałów i substancji, które funkcjonalnie odpowiadają na potrzeby człowieka. Przy czym należy dodać, że część potrzeb generuje środowisko businessu. W efekcie do środowiska trafiają już miliony substancji. Są to substancje, których los, przemiany w

środowisku i efekty toksykologiczne są względnie dobrze rozpoznane, ale są i takie, o których nic nie wiemy, nawet nie znamy struktury chemicznej.

Od dziesiątek lat do wód słodkich i morskich przenikają substancje farmaceutyczne (substancje biologicznie aktywne), w tym antybiotyki, obecność których wywołuje skutki powszechnej lekooporności. Zjawiska groźnego dla obszaru zdrowia publicznego.

W ostatnich latach przemysł dostrzegł potencjał substancji określanych mianem cieczy jonowych (IL-Ionic Liquids), których struktura podobna jest do surfaktantów. Substancje te mają właściwości niekonwencjonalnych rozpuszczalników. Ciecze jonowe są szeroko stosowane w przemyśle elektrochemicznym, energetyce, biotechnologii, chemii i procesach produkcji farmaceutycznej, gdzie pełnią funkcję aktywnych składników farmaceutycznych (API), które mogą poprawić skuteczność istniejących leków. Ciecze jonowe wykazują zdolność do zwiększania rozpuszczalności słabo rozpuszczalnych farmaceutyków, zwiększając tym samym ich biodostępność.

Niestety, jednocześnie wykazują one interkalację z błonami komórkowymi, prowadząc do zmian w organizacji molekularnej błony i zwiększenia jej przepuszczalności.

Występowanie w środowisku farmaceutyków jest od lat potwierdzone, względnie dobrze znane są poziomy zanieczyszczenia antybiotykami wód różnego typu, jak też i tendencje do zmian. Wiedza na temat zanieczyszczenia wód cieczami jonowymi jest na etapie początkowego poznania.

Według Doktorantki do najważniejszych spostrzeżeń wynikających z analizy dostępnych publikacji można zaliczyć brak danych dotyczących wpływu mikrozanieczyszczeń na mikroorganizmy morskie i wód słonawych, skupienie badaczy na ostrych efektach toksycznych (mniej na chronicznych skutkach działania tych związków), a także skąpe informacje dotyczące oddziaływania zanieczyszczeń w postaci mieszanin. Biorąc pod uwagę udokumentowane, szerokie występowanie pozostałości farmaceutyków w środowisku oraz pojawiające się obawy dotyczące cieczy jonowych, kluczowe staje się zbadanie wpływu mieszanin tych związków na organizmy występujące w środowisku wodnym. Przy czym ocenę wykonano w oparciu o niekorzystny wpływ na procesy fotosyntezy oraz mechanizmy fotoprotekcyjne i antyoksydacyjne.

Wykorzystanie organizmów wskaźnikowych do oceny jakości różnych elementów środowiska jest naturalnie uzasadnione i pożądane.

W rezultacie dokonanego przeglądu stanu wiedzy, Doktorantka sformułowała następujące cele badawcze:

1. Ocena i porównanie wrażliwości morskich i słonawowodnych mikroorganizmów fotosyntetyzujących na niskie stężenia pojedynczych zanieczyszczeń oraz ich mieszanin. Analiza ta obejmowała określenie efektywnego stężenia powodującego 50% inhibicji (EC50) parametru maksymalnej fotochemicznej wydajności fotosystemu PSII (Fv/Fm) i została przeprowadzona zgodnie z wytycznymi OECD 201 dotyczącymi testowania substancji chemicznych (OECD, 2011).
2. Zbadanie podstawowych mechanizmów działania poszczególnych związków oraz ich mieszanin poprzez wykorzystanie niestandardowych biomarkerów. Analiza obejmowała ocenę wpływu wybranych związków na wzrost oraz procesy fizjologiczne mikroorganizmów morskich występujących w Morzu Bałtyckim, przy użyciu różnych wskaźników, takich jak aktywność enzymu antyoksydacyjnego dysmutazy ponadtlenkowej (T-SOD), wydajność 17 fotosyntetyczna (ze szczególnym uwzględnieniem fotosystemu II) oraz mechanizmy fotoprotekcyjne (np. cykl ksantofilowy).
3. Ocena potencjału toksykologicznego oraz możliwego wzrostu toksyczności cieczy jonowych w połączeniu z innymi organicznymi mikrozanieczyszczeniami, w tym wybranymi farmaceutykami i kofeiną – wskaźnikiem zanieczyszczenia antropogenicznego. Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem teoretycznych modeli addytywności (Concentration Addition CA) i niezależnego działania (Independent Action IA) oraz obliczeń wskaźnika odchylenia modelu (Model Deviation Ratio MDR) w celu ilościowego określenia odchylenia od przewidywanych efektów addytywnych.
4. Zbadanie dokładności modeli CA i IA w charakteryzowaniu zaobserwowanych efektów dwuskładnikowych mieszanin zawierających cieczy jonowe oraz inne mikrozanieczyszczenia organiczne.

Celem artykułu przeglądowego, którego Dyplomantka jest pierwszym autorem, było kompleksowe przedstawienie dostępnych informacji na temat wpływu pozostałości antybiotyków i ich mieszanin na mikroorganizmy autotroficzne, ze szczególnym uwzględnieniem zielonych alg morskich i sinic, w tym informacji o potencjalnych sposobach działania w oparciu o ocenę niekorzystnego wpływu na procesy fotosyntezy oraz mechanizmy fotoprotekcyjne i antyoksydacyjne.

Wnioski z tego przeglądu stanowiły wyraźną inspirację dla celu doktoratu.

Zaś treść publikacji oraz fakt, że Doktorantka jest pierwszym autorem tej publikacji (i autorem korespondencyjnym) wskazuje na solidne przygotowanie teoretyczne Doktorantki do realizacji pracy oraz potwierdza opanowanie ogólnej wiedzy teoretycznej w zakresie tematyki pracy.

3. Kryterium merytoryczne, uzasadniające nadanie stopnia doktora.

Wg ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* rozprawa doktorska powinna:

- ❖ stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego (co znajduje wyraz w postawionej w niej tezie lub tezach szczegółowych),

- ❖ dowodzić ogólnej wiedzy teoretycznej doktoranta w zakresie tematyki pracy oraz
- ❖ dowodzić umiejętności prowadzenia samodzielnie pracy naukowej.

Na podstawie oceny dotychczasowego stanu wiedzy Doktorantka sformułowała następujące hipotezy badawcze, cytując:

1. Obecność wybranych cieczy jonowych, farmaceutyków oraz produktów ich transformacji, kofeiny jako składników mieszanin mikrozanieczyszczeń prowadzi do efektów wynikających bezpośrednio z interakcji między składnikami mieszanin, w tym synergizmu lub antagonizmu.
2. Przewlekła ekspozycja na niskie stężenia pojedynczych związków lub ich mieszanin może negatywnie wpływać na procesy fotosyntetyczne i mechanizmy fotoprotekcyjne zachodzące u mikroorganizmów fotoautotroficznych, prowadząc do stresu oksydacyjnego
3. Zastosowanie czułych, niespecyficznych biomarkerów umożliwia identyfikację mechanizmów działania badanych substancji oraz wykrywanie subtelnych zmian fizjologicznych przed wystąpieniem mierzalnego zahamowania wzrostu.
4. Badane gatunki okrzemek, zielenic i cyjanobakterii wykazują zróżnicowane reakcje oraz różny stopień wrażliwości na ekspozycję na testowane substancje i ich mieszaniny.

Doktorantka, w moim przekonaniu, zastosowała poprawną metodologię badań dobrze ją udokumentowała, a także zadbała jakość uzyskanych wyników.

Wskazuje to na dużą dojrzałość Doktorantki w odniesieniu do sposobu przygotowania się i później prowadzenia prac eksperymentalnych.

Przedstawione w publikacjach wyniki potwierdziły postawione hipotezy badawcze, jednocześnie wniosły nowe elementy do światowej puli wiedzy.

Zainteresowania Doktorantki, zrealizowane w postaci pracy doktorskiej, dotyczą obszaru, który od lat wzbudza niepokój świata nauki, społeczeństwa oraz władz, a mianowicie wzrostu zanieczyszczenia środowiska wodnego/morskiego w zakresie spektrum nowych substancjami, poziomu ich stężeń i przemian w środowisku oraz ich roli w zaburzeniach funkcjonowania ekosystemów wodnych.

Głównym celem niniejszej pracy było uzupełnienie wiedzy na temat ryzyka środowiskowego związanego z występowaniem mieszanin mikrozanieczyszczeń organicznych. Badania koncentrowały się na wpływie cieczy jonowych (IM1-12Br oraz IM1 8C(CN)3), antybiotyku oksytetracykliny, metabolitu leku przeciwdrgawkowego karbamazepiny -10,11-epoksydu karbamazepiny oraz stymulanta kofeiny na wybrane mikroorganizmy, w tym cyjanobakterię *Microcystis aeruginosa*, zielenicę *Chlorella vulgaris* oraz okrzemkę *Phaeodactylum tricornutum*.

Za bardzo cenne poznawczo i innowacyjne w podejściu uznają:

- badanie wpływu mieszanin substancji złożonych z zanieczyszczenia „starego” (antybiotyki), którego poziomy w środowisku i negatywne skutki są już względnie dobrze rozpoznane i nowych zanieczyszczeń, jakimi są ciecze jonowe (coraz chętniej stosowane w szeregu procesach technologicznych na dużą skalę). Wyniki badań wykazały negatywny wpływ cieczy jonowych i mieszanin, zależny od stężenia, na procesy fizjologiczne i biochemiczne wytypowanych do badań mikroorganizmów;
- zastosowanie w badaniach organizmów żyjących naturalnie w wodach morskich i słonawych przy jednoczesnej obserwacji zmiany parametrów, które nie są standardowo stosowane w testach jako punkt końcowy, a mianowicie analiza fluorescencji chlorofilu a oraz zmian w składzie barwników (w tym chlorofilu i ksantofilu oraz fikobilin). Zgadzam się z sugestią Doktorantki, że indykatory te, jako czułe wskaźniki wczesnych odpowiedzi stresowych mikroorganizmów, powinny być szerzej uwzględniane w przyszłych badaniach zarówno laboratoryjnych jak i środowiskowych;
- niezwykle cenne, a rzadko podejmowane przez naukowców, badania wpływu na wybrane organizmy wskaźnikowe mieszanin substancji prowadzone w testach subchronicznych (10-11 dniowe), czyli obserwacja efektów addycji, synergizmu, antagonizmu w dłuższym okresie czasowym, co ma ogromne znaczenie dla poznania opóźnionych efektów fizjologicznych, potencjalnych mechanizmów regeneracyjnych i adaptacyjnych;
- włączenie modeli prognostycznych CA oraz IA do oceny efektów toksykologicznych będących efektem interakcji analizowanych substancji;
- wybór rzadko spotykanego obszaru badań – wody morskie i słonawe. Szczególnie istotne dla poznania problemów środowiska Morza Bałtyckiego;
- ciekawy, choć nie zaskakujący, jest wynik badania interakcji zachodzących w mieszaninach cieczy jonowej IMI-8C(CN)₃ i kofeiny. Badania wykazały, że kofeina zmniejsza toksyczne działanie cieczy jonowej. Przeważające antagonistyczne interakcje zostały zidentyfikowane przez oba modele.

Chciałabym mocno podkreślić, że w publikacjach zawarta jest szeroka, bardzo interesująca i dojrzała dyskusja wyników z odniesieniem do danych prezentowanych w światowej literaturze. Nie mam zastrzeżeń do poziomu merytorycznego dyskusji. Doktorantka ostrożnie wyciąga wnioski, wskazując na potencjalnie inne czynniki

mogące wpływać na wyniki i ich interpretację oraz sugeruje kierunki prowadzenia dalszych badań.

Wnioski mają uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach i potwierdzają realizację celu pracy.

Podsumowując, Doktorantka właściwie zaplanowała zadania badawcze, przeprowadziła oznaczenia z wykorzystaniem nowoczesnych metod bioanalitycznych oraz wykonała statystyczną ocenę wyników, **wykazała się przy tym umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej**, jednocześnie wykazując zdolność do współpracy z gronem naukowców-specjalistów.

Jednocześnie ciekawi mnie Pani zdanie, stąd proszę o komentarz, do słów David'a Attenborough, brytyjskiego biologa, ekologa, który twierdzi, że przyroda oceanów sobie poradzą z obecnym zanieczyszczeniem wód, tylko ludzkość powinna zaprzestać tego procederu.

Wnioski końcowe:

W konkluzji stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji praca doktorska pani mgr Lilianny Sharma spełnia ustawowe kryteria stawiane pracom doktorskim (ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668) wraz z późniejszymi zmianami), tj.:

- rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego,
- Doktorantka wykazuje się ogólną wiedzę teoretyczną w dziedzinie *nauk ścisłych i przyrodniczych* w dyscyplinie *nauki o Ziemi i środowisku*,
- przedstawiony mi do oceny materiał, potwierdza umiejętność Doktorantki w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Powyższe uzasadnia postawienie wniosku o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Lilianny Sharma i dopuszczenie Jej do publicznej obrony, co niniejszym czynię.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę:

- ciekawą i ważką tematykę pracy doktorskiej;
- wykorzystanie niestandardowych punktów końcowych do obserwacji efektów toksyczności oraz ich obserwacja w dłuższym okresie czasu (testy subchroniczne);

- interesujące wyniki dotyczące współoddziaływania mieszanin zanieczyszczeń na organizmy autofototroficzne;
- fakt sprawnego opublikowania rezultatów badań w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania i uznanej renomie w świecie naukowym;
- niewątpliwy, znaczący i wiodący udział Doktorantki w koncepcji badań i opublikowaniu wyników;
- sfinansowanie badań z pozyskanego projektu Preludium¹.

¹ Project 'Ecotoxicity assessment of mixtures of micropollutants with emphasis on selected Baltic microorganisms – BaltiMTox' ("Ocena ekotoksyczności mieszanin mikrozanieczyszczeń względem wybranych mikroorganizmów bałtyckich – BaltiMTox") financed by the National Science Centre within the framework of Preludium grant No. 2021/41/N/NZ9/00315 coordinated by Lilianna Sharma

wnoszę do Rady Instytutu IO PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Lilianny Sharma.



Gdańsk, 01.09.2025