

Dr hab. Magda Caban, prof. UG

10.07.2025 r. Gdańsk

Katedra Analizy Środowiska

Wydział Chemii

Uniwersytet Gdański

RECENZJA

Pracy doktorskiej Pani mgr Lilianny Sharmy pt.

*„Wpływ mieszanin nowo pojawiających się zanieczyszczeń na mikroorganizmy fotoautotroficzne
Morza Bałtyckiego”*

Promotor pracy: prof. dr hab. Ksenia Pazdro

Promotor pomocniczy: dr Grzegorz Siedlewicz

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Oceanologii Polskiej Akademii Nauk. Składa się z tematycznie powiązanych publikacji o łącznym IF 35,6. Moją recenzję podzieliłam na następujące części:

Ocena układu rozprawy, w tym informacje o jej poszczególnych składowych częściach

Rozprawa doktorska rozpoczyna się od wykazu 5 publikacji wchodzących w skład cyklu artykułów naukowych. Doktorantka przedstawia także projekt naukowy, którym kierowała pt. „Ocena ekotoksyczności mieszanin mikro-zanieczyszczeń względem wybranych mikroorganizmów bałtyckich”. Był to projekt typu Preludium finansowany z Narodowego Centrum Nauki. Dyplomarka wskazuje także finanse statusowe Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk jako drugie źródło wspierania badań. Następnie przedstawiony jest spis treści, w tym streszczenie w języku polskim i angielskim. Każdy z tych podsumowań zajmuje 12 stron. Są to wersje tożsame. Kolejne części rozprawy to cykl 5 publikacji naukowych. Załączono je razem z suplementami oraz oświadczeniami współautorów o wkładzie w powstanie prac.

Ocena zastosowanego piśmiennictwa: Doktorantka w sposób prawidłowy cytuje publikacje naukowe w podsumowaniach, przy czym w większości są to własne badania. Dodatkowa cytowana literatura znajduje się na stronie 28.

Wskazanie oraz ocena celu pracy kandydata

Hipotezy oraz cele badawcze przedstawione są w podsumowaniach cyklu publikacji. Głównym celem pracy było uzupełnienie wiedzy na temat ryzyka środowiskowego związanego z występowaniem mieszanin mikro-zanieczyszczeń organicznych. Doktorantka wskazuje także cztery konkretne cele badawcze, które opisane są na stronie 17 i 18, stąd nie będę ich przywoływać w całości. Na stronie 18 znajduje się opis hipotez w ilości 4. Zarówno cele badawcze, jak i hipotezy wynikają ze stanu wiedzy a raczej braku w tej wiedzy zaznaczonego na stronach od 14 do 17. Przesłanki do podjęcia się badań są klarowne, aczkolwiek pewne wątpliwości budzi wybór konkretnych mikro-zanieczyszczeń spośród wielu innych wykrywanych w większych ilościach w wodach naturalnych.

Ocena części rozprawy doktorskiej dotyczącej omówienia wyników badań

Opis wyników w formie streszczonej znajduje się na stronach 19 do 27. Opis ten uznaję za mocną stronę rozprawy doktorskiej. W sposób niezwykle zwinny, ale także klarowny i konsekwentny dyplomata przedstawia kolejne cele badawcze, pomijając zawiłe elementy procedur, które przecież znaleźć można w konkretnych publikacjach. Natomiast opis głównych wyników jest na tyle szczegółowy, że pozwala na odpowiedzi na podstawowe pytania. W czytaniu tej części pomagają wytluszczenia tekstu. Tak przedstawione podsumowanie kilkuletnich badań sprawia, że publikacje łączą się w spójną całość, zazębiają oraz uzupełniają.

Informacje dotyczące praktycznego zastosowania uzyskanych wyników

Publikacje powstały jako rezultat prowadzonych badań laboratoryjnych, są więc raczej z dziedziny badań podstawowych i nie mają bezpośredniej aplikacyjności w naukach stosowanych. Należy jednak zwrócić uwagę, że modele toksyczności mieszanin wspomagają ogólną wiedzę dotyczącą

zanieczyszczeń środowiska a w dziedzinie tej mamy wiele do poprawy. Zdrowie środowiskowe to także zdrowie człowieka, stąd każde nowe informacje w temacie wpływu zanieczyszczeń na środowisko są cenne w późniejszych przewidywaniach i planowaniu ewentualnych działań zaradczych.

Ocena czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego

Przedstawiono do oceny rozprawa doktorska stanowi dzieło o charakterze oryginalnym. Toksyczność mieszanin tak zwanych mikro-zanieczyszczeń środowiska to dziedzina rozwijająca się. Niewiele jest publikacji naukowych, które łączą badania różnego typu mikro zanieczyszczeń, w tym przypadku cieczy jonowych, stymulantów, antybiotyków i metabolitów popularnie stosowanych leków. Zadania badawcze tego typu wymagają nowatorskiego podejścia, ponieważ brak jest wytycznych referencyjnych. Należy jednak zaznaczyć, że narzędzia i metody stosowane pracy są powszechnie dostępne i w tym zakresie doktorantka nie rozwinęła tematu, nie wprowadziła innowacyjnych podejść w analitykę oraz nie zwalidowała narzędzi, co wyjaśnię później.

Ocena czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz dyscyplinach oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

Na podstawie lektury rozprawy doktorskiej nie mam wątpliwości, że Pani magister Lilianna jest materiałem na samodzielnego pracownika naukowego. Doktorantka stawia odpowiednie pytania i buduje plan badawczy tak aby na nie odpowiedzieć. Ma to także odzwierciedlenie w uzyskaniu projektu prelude, który jest recenzowany dwuetapowo przez ekspertów w danej dziedzinie. Uzyskanie i rozliczenie tego typu projektu świadczy o jakości badań doktorantki. W 3 publikacjach eksperymentalnych była pierwszym autorem, a jak podają załączone oświadczenia doktorantka miała znaczący wkład w części badawcze i koncepcyjne prac.

Ocena indywidualnego wkładu kandydata w powstanie pracy

Ocenę indywidualnego wkładu Doktorantki w powstanie publikacji wykonałam na podstawie załączonych oświadczeń i stwierdzam, że miała znaczący udział w przeprowadzeniu eksperymentów

oraz w pisaniu publikacji naukowych. W niektórych przypadkach brała także udział w przygotowaniu procedur badawczych i analizach wyników. Na co należy jednak zwrócić uwagę w większości oświadczeń przygotowanie odpowiedzi na recenzję przypadło innym autorom. Nie jest to spójne jednak z tym przy większość publikacji występuje jako autor korespondencyjny odpowiadający zazwyczaj za przygotowanie recenzji.

Informacje o ewentualnych nieprawidłowościach, które pojawiły się w ocenianej rozprawie doktorskiej

Poniżej przedstawię kilka uwag które nasunęły mi się po lekturze podsumowania rozprawy doktorskiej oraz cyklu publikacji. Uwagi te są mojej troski o rzetelność uzyskanych wyników.

- Napisano, że ciecze jonowe to sole pozostające w stanie ciekły w temperaturze pokojowej. Ta cecha charakterystyczna jest tylko dla tak zwanych niskotemperaturowych cieczy jonowych. Definicji cieczy jonowych jest kilka. Niektóre mówią o granicy stanu ciekłego na 100°C.

- Chciałabym zwrócić uwagę Doktorantce na ciekawe zagadnienie lekowych cieczy jonowych, których kation lub anion bazują na leku, bądź oba te komponenty są lekami. Badań tego typu związków chemicznych uzupełniło by w wiedzę, którą doktorantka uzyskała w trakcie przeprowadzania badań doktorskich.

- Jednym z celów badawczych była ocena wrażliwości organizmów morskich i słonowodne fotosyntezujących na niskie stężenia zanieczyszczeń. Sformułowanie niskie nie jest ilościowe.

- Nie zgodzę się ze stwierdzeniem, że epoksyd karbamazepiny to główny jej metabolit. Jest to tak zwany metabolit pierwotny, który dalej ulega hydrolizie, gdyż epoksydy są mało stabilne w warunkach wodnych. Należałoby się więc zastanowić nad wyborem innego metabolitu karbamazepiny, bardziej stabilnego w warunkach środowiskowych. Przegląd metabolitów karbamazepiny znajduje się w pracy <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3349991/>. Zgodzę się

z wyborem metabolitu jako w związku badanego w środowisku, gdyż karbamazepina tylko w 5 procentach jest wydalana w formie niezmienionej. Należałoby jednak przeprowadzić badania wstępne oceny występowania metabolitów tego psychoaktywnego leku a następnie przeprowadzić badania toksyczności.

- Nie zgodzę się ze stwierdzeniem, że kofeina obecna powszechnie i chronicznie w środowisku naraża organizmy na neurotoksyczność, stres oksydacyjny oraz zaburzenia rozwojowe i reprodukcyjne, co doktorantka napisała we wstępie podając literaturę Rizzi et al. Powszechnie wiadomo, że dawka czyni toksynę. W przypadku środowiskowych stężeń kofeiny i zdolności organizmów do przystosowania wątpliwe jest aby takie efekty faktycznie występowały. Dla niemal każdej więc substancji chemicznej można by powiedzieć, że wykazuje ryzyko szkodliwego oddziaływania na organizmy wodne. Analiza ryzyka powinna się opierać na realnych danych monitoringowych. W podsumowaniu zabrakło mi bardziej konkretnych informacji na temat stężeń - często podawane są jako niskie, stosunkowo niskie, zbliżone do środowiskowego. Chciałabym również zwrócić uwagę Doktorantce na sposób wyboru źródeł. Zacytowana publikacja dotyczy obecności kofeiny i 2 innych związków chemicznych w gąbkach z konkretnego miejsca. W publikacji tej znajduje się faktycznie zdanie dotyczące możliwości występowania stresu oksydacyjnego poprzez obecność kofeina dla organizmów wodnych, jednak podane są tam konkretne publikacje eksperymentalne i to je należy zacytować. Chciałabym również zasugerować Doktorantce aby w abstraktach publikacji zamieszczać jednak informacje o stężeniach, ponieważ bez nich wynikać może, że niemal każda substancja jest toksyczna w środowisku. Informacji o stężeniu nie znalazłam w publikacji numer 2, 3 i 4, znalazłem się ona jedyne w publikacji numer 5.

- Proszę o informację dlaczego test według wytycznych OECD211 trwał 11 dni, podczas gdy wytyczne tego protokołu mówią o trzydniowym narażeniu mikroorganizmów, ponieważ w takim okresie jest zapewniony wzrost logarytmiczny. W podsumowaniu wskazuje Pani, że stosując dłuższą ekspozycję niż standardowo stosowane testy można by wykazać efekty regeneracyjnej i adaptacyjnej. Po pierwsze to Pani wykonała dłuższy niż standardowo testy, ale efektów takich nie raportowała.

Test OECD211 jest testem chronicznym ponieważ w trakcie jego trwania następuje po sobie co najmniej kilka pokoleń mikroorganizmów. Ile takich pokoleń należałoby uzyskać aby mechanizm regeneracyjny lub adaptacyjny obserwować? Jak Doktorantka ocenia możliwość, że mikroorganizmy, które badała już są uodpornione na toksyczne działanie badanych mikro-zanieczyszczeń, ponieważ obcują z nimi od wielu lat w warunkach naturalnych. Proszę o opinię doktorantki w kwestii możliwości adaptacji badanych mikroorganizmów do niskich śladowych stężeń badanych substancji w okresach długoterminowych. Jakie mechanizmy samoobrony mogą występować?

- Proszę o wyjaśnienie skąd wybór oznaczenia enzymu dysmutasy nadadtlenkowej (SOD) spośród wielu różnych enzymów biorących udział w regulacji stresu oksydacyjnego. Ponadto należy w jakiś sposób zweryfikować użyteczność testkitu, który pierwotnie został wyprodukowany do analizy komórek zwierzęcych. Proszę o podanie literatury potwierdzającej aplikacyjność tego testkitu do oznaczeń w organizmach fotosyntezujących. W opisie stresu oksydacyjnego nie znalazłem informacji czy stres ten wywoływany jest bezpośrednio czy pośrednio. Czy jest to możliwe do zbadania?

- W żadnej z publikacji nie znalazłam informacji o możliwości przenikania i bioakumulacji badanych związków do komórek cyjanobakterii. Na rysunku S1 publikacji 2 pokazano wykres zmian absorpcji przy długości fali 355 roztworu oksytetracykliny w medium BBM podczas dziesięciodniowego testu. Porównano tutaj ekspozycję z i bez światła. Dla kontroli następował wzrost tej absorbencji od dnia szóstego do dziesiątego, uzyskano absorpcja była podobna dla tetracykliny w stężeniu 1. Jak rozumiem z części eksperymentalnej wyniki przedstawiono na rysunku dotyczą sytuacji bez mikroorganizmów. Stąd pytanie o bioakumulację tych związków. Po drugie w trakcie trwania testu zmienia się pH medium, natomiast informacji takich nie znalazłam w żadnej z pracy. Wpływać ona ono może na stabilność szczególnie antybiotyków, ale także na biodostępność.

- Chciałabym także pochwalić opis wyników dotyczących procesu fotosyntezy i wpływu stresorów. Widać, że Doktorantka posiada duże zrozumienie możliwości wpływu substancji chemicznych na różne etapy procesu fotosyntezy.

- Moje obawy budzi opis stężeń barwników, w szczególności w przypadku zawartości chlorofilu a pod wpływem obecności cieczy jonowych. Nie jest moim zadaniem kolejna recenzja publikacji przedstawionych w cyklu, jednak chciałabym zwrócić uwagę na możliwy błąd interpretacyjny. W pracy numer 5 w rozdziale 2.6 przedstawiono pomiar pigmentów w następujący sposób. Po ekspozycji kulturę pobrano i przefiltrowaną przez filtr z włókna szklanego, następnie zakonserwowana przez zamrożenie w -80°C . Ekstrakcji dokonano wodnym roztworem acetonu przy wspomaganiu ultradźwiękami. Następnie wykonano analizy HPLC. Rozumiem, że w podobny sposób pobierano próbki do analiz fikobilin. Wyniki zawartości pigmentów przedstawiały rysunki 3 i 4 w publikacji 5 i tutaj mam pewne zapytanie. Jeśli do ekstrakcji wzięto całą kolonię, w której było mniej komórek niż w kontroli biotycznej to oczywiste jest, że będzie tam też mniejsza ilość barwników. Jest to możliwy błąd interpretacyjny wyników, który zauważam także w innych publikacjach naukowych. Wzory zapożyczone z innych publikacji zazwyczaj podają stężenie barwnika w ekstrakcie, nie w kolonii czy biomase. Możliwym rozwiązaniem tego problemu jest normalizacja zawartości barwnika do biomasy bądź ilości komórek. Mniejszy przyrost kolonii oznacza mniejszą ilość barwnika, ale niekoniecznie mniejszą biosyntezę w pojedynczej komórce. Podobnie w publikacji 2 tabela 2 znajdują się stężenie pigmentów w μ gramach na litr co znowu sugeruje brak normalizacji na biomasę. W tej samej tabeli znajduje się co prawda zawartość pigmentu na komórkę, ale interpretacja wyników głównie opiera się na % zmiany względem kontroli.

- W publikacji numer 2, w której przedstawiono wyniki wpływu oksytetracykliny na wzrost i zawartość chlorofilu *a* w zielonych glonach, okrzemkach i sinicach, test przeprowadzono w ciągu 10 dni. Jest to dosyć długi czas ekspozycji na lek, który w takich warunkach może się hydrolizować i może być foto-niestabilny. Czy w związku z tym byłoby słuszne zbadanie zawartości antybiotyku w trakcie trwania ekspozycji?

- W niektórych z eksperymentów widzę niezgodność z wytycznymi testu OECD 211 gdyż kontrola przyrasta w stopniu niewielkim a protokół ten wymaga odpowiednio dużego wzrostu aby uznać go za prawidłowy. Przykładowo na Rysunku 1 publikacji 2 *M. aeruginosa* w ciągu pierwszych 3 dni testu przyrasta jedynie o OD 0.2. Ponadto w trakcie trwania tego testu, co pokazano na rysunku 2, 3 i 4, zmieniają się parametry fluorescencji chlorofilu także w przypadku kontroli. Czy świadczy to o zmiennych warunkach oświetlenia lub innych parametrów prowadzenia kultury? Czy występować mógł jakiś inny stresor oprócz tetracykliny? Przykładowo – koniec wzrostu liniowego związany z wyczerpaniem któregoś składnika medium wzrostowego?

- W abstrakcie publikacji 2 stwierdzono, że stężenia oksytetracykliny występujący w środowisku mogą działać na mikroorganizmy. Stężenia badane w tej pracy od 0.01 do 8 ug/ml. Równają się stężeniu 0.01 mg do 8 mg na litr, nie są to stężenie środowiskowe. Także w tej publikacji na stronie 217 błędnie porównano stężenia tetracykliny w wodzie do stężeń w osadach. W osadach przecież związki występują nie na mililitry, ale na gramy. Nie należy więc 2 tych stężeń porównywać do siebie.

- Moje obawy budzi raportowanie zawartości fikoerytryny w *M. aeruginosa*. Z pracy o doi 10.1046/j.1440-1835.1998.00124.x można wyczytać, że:

„Since no species of *Microcystis* has ever been reported to have phycoerythrin, the existence of phycoerythrin separates these four strains from the known species of *Microcystis*, and might enable them to be classified as a new species.”

Sama również analizowałam barwniki w tej sinicy i po samym widmie UV-Vis nie stwierdziłam obecności fikoerytryny. Wiem że istnieją publikacje analizujące ten barwnik w *M. aeruginosa*, ale dlatego konkretnego szczepu należy najpierw przeprowadzić badania inne niż fluorescencyjne. Proszę o podanie literatury potwierdzającej obecność tego barwnika (w publikacji M. Sobiechowska-Sasim et al. takiej informacji nie podano). Niestety korzystanie z równań na zawartość pigmentów w

ekstraktach buforowych, szczególnie zapożyczonych z innych publikacji, może sugerować zawartość tej tego barwnika. W obecności dużej zawartości fikocyjaniny może wystąpić fałszywie dodatni sygnał dla fikoerytryny. Ponadto, także w tym przypadku brak jest normalizacji na masę.

- Kontynuując ten wątek: w tabeli S5 publikacji 4 znajdują się stężenia fikoerytryny w *M. aeruginosa*. Stężenia te są rzędu 0.001 do 0.009 ng/l, czyli kilka **pg na l**. Jaka jest granica detekcji oznaczania fikoerytryny jeśli faktycznie ten pigment występuje w badanej sinicy. Nie znalazłam także granic oznaczalności innych pigmentów w żadnej z prac. Tylko podanie zakresu liniowej odpowiedzi umożliwia stwierdzenie czy uzyskane stężenie pigmentu jest precyzyjne i dokładne i może być używane jako parametr ilościowej odpowiedzi. W cytowanej pracy autorstwa Sobiechowska-Sasin wykazano minimalne stężenia fikobilin na 0.001 ug/ml czyli 0.001 mg/L = **1 ug/l**. W pracy tej także nie znalazłam potwierdzenia na obecności fikoerytryny u *M. aeruginosa*. Znajduje się tam rysunek 6

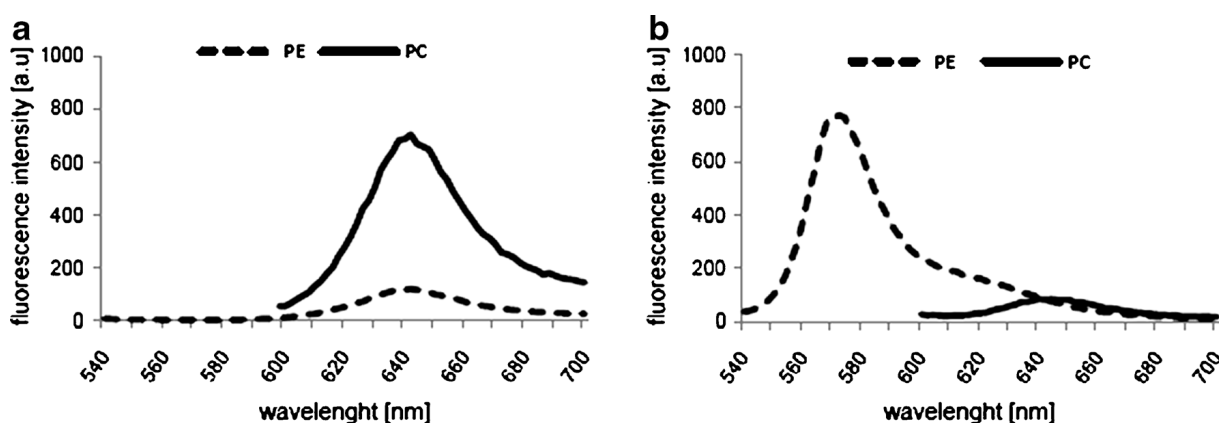


Fig. 6. Emission spectra obtained for selected monoculture extracts. a *Microcystis aeruginosa*. b *Synechococcus* sp.

Natomiast w tekście $\lambda_{ex}=530$ nm i $\lambda_{em}=576$ nm. Jest więc inna długość emisji dla fikoerytryny (PE), co dowodzi braku obecności PE w *M. aeruginosa*.

W pracy tej napisano „PC was found in all extracts, occurring more abundantly than PE in three of the four species analyzed, giving a strong signal and a characteristic reddish colouration in *Synechococcus* sp.; APC was not found (Figs. 6 and 7).” Natomiast na tych rysunkach nie ma

potwierdzenia obecności w *M. aeruginosa*, jak napisałam wyżej. Tym bardziej potrzebna jest literatura potwierdzająca obecność fikoerytyny w badanym szczepie *M. aeruginosa*.

Proszę odpowiedzieć czy stężenia jakichkolwiek pigmentów przedstawione w pracach dotyczą stężeń w uzyskanym ekstrakcie czy wy objętości kolonii wziętej do ekstrakcji. Jeśli był to przypadek drugi proszę o podanie jak zostało to obliczone. Jeśli korzysta się ze wzorów z cytowanych publikacji są to raczej stężenia w ekstraktach. Natomiast w tabelach z zawartościami pigmentów opisano je jako stężenia w sinicach, co sugeruje zawartość w komórkach.

- Publikacja 5 przedstawia wpływ mieszaniny kofeiny i cieczy jonowych na sinice i okrzemki. Tu także głównymi parametrami odpowiedzi jest fluorescencja chlorofilu oraz zawartość pigmentów. Ponadto badano enzym SOD. Są więc to te same parametry badane w poprzednich 3 pracach eksperymentalnych a same publikacje są technicznie podobne. Warto więc w przyszłości publikując taki cykl zróżnicować markery odpowiedzi. Jakie inne parametry odpowiedzi komórkowej poza łatwo badanymi przez panią Doktorantkę (fluorescencja chlorofilu i zawartość barwników) można przebadac aby lepiej poznać mechanizmy wpływu badanych mikro-zanieczyszczeń na wzrost i biochemię mikroorganizmów fotoautotroficznych.

Pomimo pewnych krytycznych uwag, całość pracy doktorskiej to wartościowa pozycja dla rozwoju dyscypliny chemii środowiskowej. Rozprawa doktorska w mojej ocenie **spełnia wymogi merytorycznych i wymogi formalne Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668)** i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,
dr hab. Magda Caban, prof. UG