

Dr hab. Małgorzata Bąk, prof. US

Szczecin, dn. 11.08.2025

### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Lilianny Marii Sharmy**

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

Rozprawa doktorska mgr Lilianny Marii Sharmy pt. „Wpływ mieszanin nowo pojawiających się zanieczyszczeń na mikroorganizmy fotoautotroficzne Morza Bałtyckiego” została napisana w Instytucie Oceanologii Polskiej Akademii Nauk (IO PAN) pod kierunkiem prof. dr hab. Kseni Pazdro, jako promotor oraz dr. Grzegorza Siedlewicza, jako promotora pomocniczego. Recenzowaną rozprawę stanowi zbiór pięciu publikacji powiązanych tematem badań, czyli badaniami wpływu wybranych zanieczyszczeń na tzw. glony występujące w Morzu Bałtyckim. Publikacje te ukazały się w recenzowanych czasopismach. Pierwsza publikacja ukazała się w *Plants* (IF – 4,6 i 70 pkt. na liście ministerialnej), druga publikacja w *Oceanologia* (IF – 2,4 i 100 pkt.), trzecia i czwarta w *Science of the Total Environment* (IF – 8,2 i 200 pkt.), a piąta w czasopiśmie *Journal of Hazardous Materials* (IF – 12,2 i 200 pkt.). Wszystkie publikacje składające się na rozprawę są pracami zespołowymi. W czterech Doktorantka jest pierwszą autorką i autorką korespondencyjną, w jednej, opublikowanej w *Oceanologii*, jest trzecią autorką. Pomimo, że praca powstała z połączenia pięciu artykułów, stanowi ona zwartą i spójną całość.

Rozprawę rozpoczyna Podsumowanie (Summary) w języku angielskim i polskim (choć pewnie lepszym określeniem byłaby Synteza). Na wstępie Doktorantka daje syntetyczny opis mikrozanieczyszczeń z podziałem na farmaceutyki, ciecze jonowe i inne powszechnie występujące w wodach związki, jak kofeina oraz wstępnie naświetla problemy jakie nawet niewielkie ilości tych związków mogą powodować w środowisku wodnym, szczególnie dla mikroorganizmów fotosyntetyzujących, które są podstawą piramidy troficznej każdego wodnego ekosystemu. Doktorantka podkreśla fakt konieczności prowadzenia badań nie tylko nad toksycznością pojedynczych związków, ale także dotyczących mieszanin mikrozanieczyszczeń oraz w szczególności nad długofalowymi skutkami kontaktu organizmów z toksynami. Powyższe rozważania są wprowadzeniem do stwierdzenia, że bez znajomości interakcji oraz skutków chronicznego oddziaływania na mikroorganizmy autotroficzne wiedza na temat toksyczności mikrozanieczyszczeń jest dalece niepełna. Dalej Doktorantka krótko opisuje problemy morskich ekosystemów przybrzeżnych jako tych, które są szczególnie narażone na kumulację mikrozanieczyszczeń oraz wskazuje Morze Bałtyckie, jako doskonały poligon badawczy ze względu na dużą zlewnię, silne zanieczyszczenie i wrażliwe ekosystemy słonawowodne. Wstęp zamyka sformułowanie głównego celu przedłożonej do recenzji dysertacji, czyli uzupełnienie wiedzy na temat ryzyka środowiskowego związanego z występowaniem mieszanin mikrozanieczyszczeń organicznych. Doktorantka skupiła się w swoich badaniach na pięciu substancjach: dwóch

cieczach jonowych, antybiotyku, metabolicie leku przeciwdrgawkowego i powszechnie identyfikowanym stymulancie – kofeinie. Do syntezy cyklu artykułów Doktorantka wybrała tylko trzy występujące w Bałtyku mikroglony – cyjanobakterię *Microcystis aeruginosa*, zielenicę *Chlorella vulgaris* i okrzemkę *Phaeodactylum tricornutum*, choć w załączonych publikacjach Doktorantka badała także kilka innych gatunków. Wszystkie trzy uwzględnione mikroorganizmy uważane są za gatunki modelowe, są proste w hodowli oraz zostały wszechstronnie przebadane przez różnych badaczy. Cel główny doktorantka rozbiła na cztery cele badawcze:

- 1) Zbadać wrażliwość poszczególnych gatunków na pojedyncze substancje oraz ich mieszaniny poprzez określenie efektywnego stężenia powodującego 50% zahamowanie maksymalnej fotochemicznej wydajności fotosystemu;
- 2) Zbadać podstawowe mechanizmy działania poszczególnych związków oraz ich mieszanin, poprzez wykorzystanie niestandardowych biomarkerów, jak aktywność antyoksydantu dysmutazy ponadtlenkowej, wydajność fotosyntetyczna oraz skuteczność mechanizmów fotoprotekcyjnych;
- 3) Zbadać potencjał toksyczności cieczy jonowych oraz wpływu innych substancji, takich jak antybiotyk czy kofeina na wzrost tej toksyczności z wykorzystaniem teoretycznych modeli addytywności (CA) i niezależnego działania (IA) oraz wskaźnika odchylenia modelu (MDR) w celu ilościowego określenia odchylenia od przewidywanych efektów addytywnych;
- 4) Zbadać dokładność wyżej wymienionych modeli poprzez porównanie ich predykcji z otrzymanymi wynikami wpływu dwuskładnikowych mieszanin na badane organizmy.

Doktorantka prawidłowo sformułowała 4 hipotezy badawcze, które bardzo dobrze zweryfikowała i potwierdziła wynikami swoich badań, zawartych w załączonym cyklu publikacji.

Załączone publikacje są opatrzone oświadczeniami współautorów o udziale każdego z nich w przygotowaniu pracy. Doktorantka we wszystkich pięciu pracach przygotowała koncepcję pracy, zaplanowała i zrealizowała prace badawcze, brała udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników, brała udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. W czterech publikacjach na pięć, była odpowiedzialna za korespondencję z czasopismami i przygotowanie poprawek i odpowiedzi dla recenzentów. Wprawdzie Doktorantka nie podaje procentowego wkładu w powstałe publikacje, ale po oświadczeniach wszystkich współautorów oraz po notatkach o wkładzie pracy w samych publikacjach widać, że wkład pracy Doktorantki był wiodący, nawet w pracy, gdzie jest trzecią współautorką w kolejności.

Celem pierwszej publikacji było przedstawienie stanu (na rok 2021) wiedzy o antybiotykach i ich wpływie na mikroorganizmy fotosyntetyzujące na podstawie istniejącej na ten temat literatury. Jest to bardzo rzetelnie napisana praca przeglądowa, która umożliwiła Doktorantce poznanie aktualnego stanu wiedzy i pomogła odnaleźć luki, które można uzupełnić badaniami. Widać, że praca ta nakierunkowała Doktorantkę na przyszłe badania, gdyż szczegółowo wskazała ona braki w wiedzy, a następnie skrupulatnie uzupełniała je w kolejnych swoich badaniach, a wyniki prezentowała w następnych publikacjach. Z

przeglądu literatury wynika, że pozostałości antybiotyków są obecne na całym świecie w ekosystemach słodkowodnych, estuariach i morskich środowiskach. Przegląd dotyczył ponad 60 różnych antybiotyków i ich wpływu na organizmy autotroficzne, ze szczególnym naciskiem na mikroglony morskie. Aż 60 % danych dotyczyło tylko jednego gatunku słodkowodnej zielenicy – *Raphidocelis subcapitata*, natomiast dane dotyczące gatunków morskich stanowiły mniej niż 14 % dostępnych informacji. Jedynie 9 % analiz odnosiło się do ekspozycji na działanie antybiotyków trwającej dłużej niż 7 dni, co wskazywało na poważną lukę w badaniach długofalowych skutków. Praca podsumowuje efekty na wielu poziomach: procesy fotosyntezy, mechanizmy fotoprotekcji i antyoksydantów, itp. Autorzy podkreślali, że ryzyko oceniane było głównie na podstawie testów ostrej toksyczności i pojedynczych substancji w środowisku słodkowodnym oraz sugerowali rozszerzenie badań o eksperymenty długoterminowe, postulowali stosowanie stężeń rzeczywistych identyfikowanych w środowisku naturalnym, a przede wszystkim zalecali badania efektów mieszanin i interakcji z czynnikami środowiskowymi, co ma znaczenie dla dokładniejszych ocen zagrożeń ekologicznych.

W ramach badań opisanych w drugim artykule autorzy przeprowadzili 10-dniowe testy toksyczności oksytetracykliny (antybiotyku z grupy tetracyklin) w szerokim zakresie stężeń, zwracając szczególną uwagę na niskie, środowiskowo realistyczne stężenia. Testowano wpływ antybiotyku na cztery organizmy: zielenicę *Chlorella vulgaris*, okrzemkę *Phaeodactylum tricornutum* oraz cyjanobakterie *Microcystis aeruginosa* i *Nodularia spumigena*. W publikacji połączono klasyczne parametry wzrostu (liczba komórek, gęstość optyczna, stężenie chlorofilu *a*) z pomiarami fluorescencji chlorofilu *a*, które umożliwiły ocenę wydajności fotosystemu II (PSII) oraz ogólnego stanu fotofizjologicznego organizmów. Autorzy dowiedli, że stężenia oksytetracykliny występujące w środowisku mogą negatywnie wpływać na rozwój badanych mikroorganizmów. Efektywność fotosystemu II została obniżona, co świadczy o zaburzeniu procesu fotosyntezy. Analiza parametrów fotosyntetycznych umożliwiła głębsze zrozumienie mechanizmów działania antybiotyku wobec organizmów niebędących celem terapii antybiotykowej. Autorzy zakwestionowali standardowe testy przewlekłej toksyczności trwające zazwyczaj 72 godziny, twierdząc, że są niewystarczające do wiarygodnego oszacowania długotrwałych skutków działania substancji bioaktywnych. Z tego powodu zarekomendowali stosowanie wydłużonych testów, takich jak wykorzystane w badaniu 10-dniowe eksperymenty.

Skupienie się na fluorescencji chlorofilu *a* pozwoliło uchwycić subtelne zaburzenia funkcji fotosyntetycznych, wcześniej niewidoczne przy standardowych testach krótkoterminowych.

Celem trzeciej publikacji było wyjaśnienie, jak mieszanina jonowej cieczy IM1-12Br oraz antybiotyku oksytetracykliny wpływa na wybrane mikroorganizmy: okrzemkę *Phaeodactylum tricornutum*, cyjanobakterię *Microcystis aeruginosa*, zielenicę *Chlorella vulgaris* oraz luminescencyjną bakterię morską *Aliivibrio fischeri*. Eksperyment trwał 11 dni. Analizie poddano parametry fotosyntezy, takie jak kinetyka chlorofilu *a* oraz efektywność fotosystemu II, zawartość pigmentów, ze szczególnym uwzględnieniem fikobilin oraz efekty toksyczności w obecności luminescencyjnej bakterii *Aliivibrio fischeri*. W pracy wyznaczono wartości EC50 dla IM1-12Br i oksytetracykliny wobec badanych mikroorganizmów – były one często niższe niż w literaturze, co sugeruje większą

wrażliwość badanych gatunków. Cyjanobakterie okazały się najbardziej wrażliwe na IM1-12Br. Oba związki – osobno i w mieszaninie – powodowały uszkodzenia układów fotosyntetycznych PSI i PSII, spadek wydajności przenoszenia elektronów oraz zmiany w parametrach strumienia energii, co wskazuje na silny stres fotochemiczny. U sinic obserwowano degradację białek fikobilinowych (m.in. fikocyjaniny, fikoerytryny), kluczowych dla ochrony przed nadmiarem światła. W przypadku *Chlorella vulgaris* odnotowano efekt hormezy przy niskich stężeniach. Analiza interakcji za pomocą modeli CA i IA wykazała głównie synergizm w działaniu mieszaniny IM1-12Br i oksytetracykliny, szczególnie wyraźny u *Microcystis aeruginosa* oraz bakterii *Aliivibrio fischeri*. Modele te dobrze przewidywały wyniki eksperymentalne. Badanie jest pierwszym doniesieniem o synergistycznej toksyczności mieszaniny płynu jonowego i antybiotyku wobec organizmów wodnych. Autorzy zalecają dalsze prace nad mieszaninami wieloskładnikowymi, dłuższymi ekspozycjami i szerszym doбором gatunków, aby lepiej ocenić długoterminowe ryzyko ekologiczne i opracować strategię ochrony środowiska.

W czwartej publikacji badania koncentrowały się na ocenie wpływu mieszanin płynu jonowego IM1-8C(CN)<sub>3</sub> oraz dwóch farmaceutyków (antybiotyku oksytetracykliny i metabolitu karbamazepiny) – na dwa gatunki fitoplanktonowe: sinicę o szerokim spektrum tolerancji zasoleniowej *Microcystis aeruginosa* oraz morską okrzemkę *Phaeodactylum tricornutum* podczas długotrwałej ekspozycji. Analizie poddano różne wskaźniki biochemiczne i fizjologiczne: wskaźniki stresu oksydacyjnego, fluorescencję chlorofilu *a* (parametry wydajności fotosystemu II, Fv/Fm), szczegółowy profil pigmentów fotosyntetycznych i ochronnych. Zaobserwowano zakłócenia w produkcji karotenoidów i parametrach fluorescencji chlorofilu *a*, co świadczy o uszkodzeniu fotosystemu II. Modele matematyczne CA i IA, wspierane przez wskaźnik MDR, wykazały przeważnie antagonistyczne interakcje między substancjami w mieszaninach. Z badań wynika, że mieszaniny tych specyficznych zanieczyszczeń wpływają na procesy fotosyntetyczne obu badanych organizmów wodnych, głównie poprzez zakłócenia systemów ochrony i przetwarzania światła. Przewaga interakcji antagonistycznych sugeruje możliwe wzajemne hamowanie toksycznych efektów, choć mechanizmy wymagają dalszych badań.

W ramach piątej publikacji autorzy badali wpływ mieszaniny kofeiny (częstego antropogenicznego zanieczyszczenia, w stężeniu około 10 µg/l) oraz imidazolowego płynu jonowego IM1-8C(CN)<sub>3</sub> na dwa organizmy fotosyntetyczne: okrzemkę *Phaeodactylum tricornutum* oraz sinicę *Microcystis aeruginosa*, podczas przewlekłej ekspozycji. Wykorzystano niestandardowe biomarkery, m.in. zmiany w fluorescencji chlorofilu *a*, mechanizmy ochronne, jak nie-fotochemiczne wygaszanie (NPQ) oraz aktywację cyklu ksantofilowego. Modele interakcji – CA i IA, w połączeniu ze wskaźnikiem MDR, służyły do analizy natury działania mieszaniny (synergizm vs antagonizm). Oba organizmy wykazały reakcje fotoprotekcyjne, m.in. zwiększone NPQ i aktywację cyklu ksantofilowego – oznaki stresu świetlnego i adaptacji. Kofeina w środowiskowo realistycznych stężeniach znacząco podniosła parametr DIo/RC, co sugeruje zwiększone rozpraszanie energii jako mechanizm obronny. Zarówno model CA, jak i IA wykazały przeważnie antagonistyczne interakcje między kofeiną a cieczą jonową, co świadczy o możliwym wzajemnym obniżaniu toksyczności.

Nie ulega wątpliwości, że całe badawcze sformułowane w poszczególnych publikacjach, jak i w całej rozprawie zostały przez Doktorantkę osiągnięte. Nie budzi zastrzeżeń metodyka badań – badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane, a wszelkie analizy zostały przeprowadzone według standardów powszechnie stosowanych w takich badaniach. Wszystkie pięć publikacji wchodzących w skład rozprawy mają rozbudowaną część wynikową, opatrzoną graficznym przedstawieniem wyników oraz rozszerzone o materiały dodatkowe. Wyniki badań zostały poddane analizie z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi statystycznych. W dyskusji uwzględniono klasyczną, jak i najnowszą literaturę dotyczącą przedmiotu badań.

Przedstawiona do recenzji rozprawa dotyczy ważnych i w obecnych czasach pogłębiających się problemów dotyczących zanieczyszczeń środowiska Morza Bałtyckiego nowo pojawiającymi się substancjami, których toksyczności nie znamy lub nie do końca rozumiemy ich mechanizmy. Doktorantka i jej współautorzy przybliżają nam znaczący wycinek wiedzy, która wypełnia wskazaną lukę.

#### **Uwagi krytyczne:**

W zasadzie trudno jest się doszukać błędów zarówno w części wprowadzającej jak i w samych publikacjach stanowiących recenzowany cykl. Szukając na siłę można wskazać błąd, pewnie literówkę, w nazwie sinicy w jednej z opublikowanych prac, gdzie zamiast *Microcystis aeruginosa* pojawiło się *Microcystin aeruginosa*.

Dość często powtarzającym się błędem jest rozpoczynanie zdania skrótem nazwy rodzajowej, np. *M. aeruginosa*... Błąd ten nie został wychwycony przez recenzentów publikacji i redaktorów. Uprzejmie proszę zapamiętać i stosować na przyszłość zasadę rozpoczynania zdania zawsze od pełnej nazwy rodzaju.

Dość nieprecyzyjne jest określenie wzrost organizmów w znaczeniu przybywania liczby komórek w litrze. Samo określenie wzrost organizmów wskazuje raczej na powiększanie rozmiarów pojedynczych osobników.

#### **Pytania:**

Dlaczego Doktorantka nie pokusiła się o samodzielne wyizolowanie wszystkich poddanych badaniom organizmów z prób z Morza Bałtyckiego? Czy kupowanie gotowych kultur np. z Francji nie niesie ze sobą niebezpieczeństwa, że niebałtycka populacja będzie cechowała się inną reakcją na mikrozanieczyszczenia niż nasze rodzime populacje?

Czy Doktorantka ma zamiar pracować nad wdrożeniem nowych standardów dotyczących badań nad długofalowym wpływem toksycznego oddziaływania mikrozanieczyszczeń na mikroorganizmy autotroficzne?

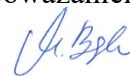
Czy Doktorantka mając obecną wiedzę widzi potrzebę zapobiegania zanieczyszczeniom substancjami takimi jak farmaceutyki czy ciecze jonowe i w jaki sposób można by to robić skuteczniej niż obecnie?

Jakie kolejne substancje potencjalnie toksyczne i ich wpływ na mikroglony należałoby przebadać w następnej kolejności?

Uważam, że dysertacja jest bardzo wartościową pozycją, stanowi oryginalne rozwiązanie przedstawionego problemu naukowego, wnosi nową wiedzę na temat toksyczności mieszanin kilku kluczowych związków określanych jako mikrozanieczyszczenia. Doktorantka wykazała, że ma ogólną wiedzę z dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych oraz szczegółową z dyscypliny nauk o Ziemi i środowisku, a w szczególności z oceanologii i toksykologii. Praca ta jest dowodem na to, że Doktorantka potrafi sformułować problem badawczy i skutecznie doprowadzić do jego rozwiązania. Z tych powodów podsumowując stwierdzam, że recenzowana praca doktorska mgr Lilianny Marii Sharmy spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w myśl art. 187 Ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. 2023 poz. 742). W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk (IO PAN) o dopuszczenie mgr Lilianny Marii Sharmy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk o Ziemi i środowisku.

Dodatkowo, ze względu na to, że przedstawiona do recenzji rozprawa cechuje się wyróżniającą jakością badań, posiada szczególne walory poznawcze, co zostało docenione poprzez bardzo dobrze opublikowane artykuły – trzy na pięć prac Doktorantka opublikowała w czasopismach za 200 punktów z bardzo wysokim Impact Factor oraz ze względu na innowacyjne podejście do badań toksyczności mikrozanieczyszczeń – Doktorantka nie trzymała się tylko i wyłącznie ustalonych standardowych, powszechnie stosowanych procedur, ale zaproponowała swoje procedury jako uzupełnienie tych standardowych, jak również ze względu walory aplikacyjne – Doktorantka opracowała metodykę badania długofalowego wpływu toksycznych związków na mikroorganizmy autotroficzne, która moim zdaniem powinna wyjść do standardów takich badań, dlatego też wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk (IO PAN) o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Lilianny Marii Sharmy.

Z poważaniem



Małgorzata Bąk