

Gdańsk, 15.10.2017 r.

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

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Aleksandry Orzoł

pt.:

**WPLYW LEKÓW WETERYNARYJNYCH NA PROCESY
METABOLICZNE SIEWEK GROCHU SIEWNEGO
(*PISUM SATIVUM* L.) I ŁUBINU ŻÓŁTEGO (*LUPINUS LUTEUS* L.)**

1. Podstawa opracowania

Podstawę do opracowania recenzji stanowi pismo dr hab. Jakuba Sawickiego, prof. UWM, Prodzikana ds. Nauki Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, z dnia 13.09.2017 r., oraz dołączona rozprawa doktorska mgr Aleksandry Orzoł pt.: „Wpływ leków weterynaryjnych na procesy metaboliczne siewek grochu siewnego (*Pisum sativum* L.) i łubinu żółtego (*Lupinus luteus*)”.

Praca została wykonana w Katedrze Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem naukowym pani dr hab. Agnieszki Piotrowicz-Cieślak, prof. UWM, w dziedzinie *nauk o biologicznych, dyscyplinie biologia*.

2. Ocena zasadności podjęcia tematu

Intensywne stosowanie antybiotyków, początkowo w medycynie, nieco później w weterynarii przyczyniło się do coraz powszechniejszej obecności tych związków w środowisku. W szczególności wymóg prawny (ale także tradycja) nawożenia obornikiem pól uprawnych, zwłaszcza tych zlokalizowanych przy intensywnym chowie zwierząt, stanowi jedną z głównych przyczyn zanieczyszczenia antybiotykami gruntów rolnych i wód gruntowych.

Od lat 50. antybiotyki były stosowane celowo w rolnictwie, przede wszystkim w sadownictwie, do ochrony owoców przed chorobami. Pierwsze doniesienia, publikowane jeszcze w latach 80., nt. wpływu antybiotyków na wzrost roślin nie budziły zbyt dużych emocji w świecie naukowym, zaś społeczeństwa żyły raczej w nieświadomości ich stosowania. Jednak względna ich trwałość i aktywność wobec bioty oraz efekt akumulowania się antybiotyków w roślinach zaczęły budzić niepokój. Z początkiem nowego tysiąclecia pojawiają się prace opisujące negatywne skutki dla roślin coraz powszechniejszego występowania antybiotyków w środowisku, a po 2010 roku rośnie liczba prac, w których autorzy zajmują się wyjaśnianiem zjawisk zachodzących w roślinach na skutek stresu antybiotykowego.

Punktem wyjścia do badań było postawienie przez Doktorantkę hipotezy, iż

(a) wybrane leki z grupy tetracyklin (tetracyklina, oksytetracyklina i chlorotetracyklina) i fluorochinolonów (lewofloksacyna i sparfloksacyna) mogą zaburzać procesy fizjologiczno-biochemiczne zachodzące w siewkach grochu siewnego i łubinu żółtego oraz że

(b) możliwe są proste zabiegi przyspieszające rozpad tetracykliny w wodzie, i ograniczające pobieranie leków przez rośliny.

Przedstawiona mi do recenzji praca wpisuje się w aktualny, światowy trend badań. Podjętą tematykę badawczą oceniam jako szczególnie cenną, a pracę uważam za nacechowaną znaczną nowością naukową.

Biorąc powyższe pod uwagę należy przyjąć, że podjęta przez Doktorantkę tematyka spełnia kryterium celowości podjęcia badań.

3. Ocena merytoryczna i formalna pracy

Od strony formalnej przedstawiona mi do recenzji praca oparta jest o cztery publikacje o sumarycznym **IF – 5,7** i sumarycznej punktacji **MNiSW – 90 pkt**, w których Doktorantka jest pierwszym autorem:

1. **Ziółkowska A.**, Piotrowicz–Cieślak A.I., Margas M., Adomas B., Nałęcz–Jawecki G. 2015. Accumulation of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline in pea (*Pisum sativum* L.). Fresenius Environmental Bulletin, 24(4):1386–1391. **IF₂₀₁₅ – 0,372; MNiSW₂₀₁₅ – 15 pkt**
2. **Ziółkowska A.**, Piotrowicz–Cieślak A.I. 2016. Sparfloxacin – a potential contaminant of organically grown plants? Applied Ecology and Environmental Research, 14(4): 29–44. **IF₂₀₁₆ – 0,681; MNiSW₂₀₁₆ – 15 pkt**

3. **Orzoł A.**, Piotrowicz–Cieślak A.I. 2017. Levofloxacin is phytotoxic and modifies the protein profile of lupin seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, doi: 10.1007/s11356-017-9845-0. **IF₂₀₁₆ – 2,741; MNiSW₂₀₁₆ – 30 pkt**
4. **Ziółkowska A.**, Margas M., Grajek H., Wasilewski J., Adomas B., Michalczyk D., Piotrowicz–Cieślak A.I. 2016. Comparison of UV-C irradiation, ozonation, and iron chelates treatments for degradation of tetracycline in water. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13:1335–1346. **IF₂₀₁₆ – 1,915; MNiSW₂₀₁₆ – 30 pkt**

Do prac dołączone są oświadczenia o wkładzie Doktorantki w powstanie w/w publikacji. We wszystkich przypadkach udział Doktorantki polegał na przygotowaniu materiału roślinnego, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu wyników, przygotowaniu graficznej formy wyników, opracowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Przedstawione dowody potwierdzają znacząco istotny udział Doktorantki w realizacji zarówno badań jak i powstawaniu publikacji.

Treść i odnośniki literaturowe podane we wstępach do publikacji wskazują, że Doktorantka zapoznała się z wiedzą niezbędną do realizacji pracy oraz, że wykazuje się ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie dyscypliny naukowej – biologia.

Celem pracy doktorskiej było wykazanie wpływu wybranych antybiotyków weterynaryjnych na procesy metaboliczne grochu siewnego i łubinu żółtego, a w szczególności:

1. określenie wpływu TC, OTC i CTC na wzrost siewek grochu; analiza zawartości węglowodanów rozpuszczalnych w korzeniach; ocena aktywności GPX w korzeniach; określenie zawartości tetracyklin w korzeniach (publikacja nr 1)
2. analiza wpływu SPX na wzrost siewek grochu siewnego oraz zawartość rozpuszczalnych węglowodanów w korzeniach; ocena aktywności GPX w korzeniach; określenie zawartości SPX w korzeniach; analiza zmian zawartości białka całkowitego w korzeniach oraz określenie profilu białkowego korzeni grochu siewnego (publikacja nr 2)
3. określenie wpływu LEV na wzrost siewek łubinu żółtego; określenie skutecznego stężenia (EC_x) oraz poziomu toksyczności (TU_x); analiza rozmieszczenia reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach; ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych (GPX i CAT) w korzeniach, łodygach i liściach; analiza zmian zawartości białka całkowitego oraz określenie profilu białkowego korzeni łubinu żółtego (publikacja nr 3)

4. dodatkowo Doktorantka rozważyła trzy metody obróbki wody zanieczyszczonej antybiotykami (naświetlanie UV-C, ozonowanie, dodawanie chelatów żelaza) (publikacja nr 4).

Przeprowadzone badania wykazały, że:

- rośliny pobierają antybiotyki z gleby;
- badane farmaceutyki indukowały w roślinach stres oksydacyjny, który powodował nadmierną produkcję reaktywnych form tlenu (ROS);
- zwiększona produkcja ROS w komórkach spowodowała wzrost aktywność enzymów stresu antyoksydacyjnego (peroksydaza gwajakolowa i katalaza);
- zastosowane antybiotyki wpływają na zawartość białek regulujących metabolizm komórek, pełniących role adaptacyjne, obronne i detoksykacyjne. Izolacja białka całkowitego wykazała zmiany w zawartości białek w korzeniach.
- pod wpływem antybiotyków następuje obniżenie zawartości węglowodanów w roślinach;
- przeprowadzona analiza świadczy o zachodzeniu różnorodnych reakcji metabolicznych w roślinach rosnących na glebie zanieczyszczonej antybiotykami.

Opracowanie metody skutecznego eliminowania tetracykliny z wodnych roztworów może przyczynić się do ograniczenia zanieczyszczenia środowiska tym antybiotykiem. Doktorantka rozważyła trzy metody obróbki wody zanieczyszczonej antybiotykami, mianowicie UV-C, ozonowanie, dodawanie chelatów żelaza. Dwie z tych metod powodowały szybki rozpad tetracykliny, okazały się więc skuteczne w usuwaniu antybiotyku, były to ozonowanie oraz zastosowanie cytrynianu żelaza (III).

Sposób wykonania badań i analiza wyników wskazuje, że Doktorantka opanowała warsztat badawczy, rozumie wagę dowodu naukowego i jest przygotowana do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

4. Uwagi o charakterze merytorycznym i formalnym

Do niewątpliwych osiągnięć Doktorantki zaliczam:

1. Istotny wkład w uzupełnianiu wiedzy w obszarze skutków narażenia roślin na antybiotyki (w szczególności Doktorantka oceniła fitotoksyczność lewofloksacyny oraz jej wpływ na modyfikację profilu białkowego łubinu żółtego),
2. potwierdzenie wyników uzyskanych przez innych autorów, co stanowi ważny element uwiarygodniania informacji naukowych pojawiających się w przestrzeni wiedzy naukowej ,
3. wykazanie skuteczności metody ozonowania i metody reakcji z żelazem III na proces usuwania badanego antybiotyku z wody.

Po zapoznaniu się z publikacjami proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących zagadnień:

1. Proszę o uściślenie informacji dotyczącej obniżenia węglowodanów w roślinach narażonych na stres antybiotykowy, czy to obniżenie było względem próbki kontrolnej czy w przeliczeniu na masę korzenia? Ponieważ przy mniejszej masie korzenia występowanie całkowitej ilości węglowodanów na niższym poziomie niekoniecznie jest zmianą.
2. Jakie są ograniczenia metod, które okazały się być skuteczne w obniżaniu poziomu stężeń badanych antybiotyków. Proszę o dyskusję w szczególności w kontekście wpływu na środowisko.
3. Kiedy mówimy o zanieczyszczeniu gleby antybiotykami, a kiedy o skażeniu?

Podsumowując, Doktorantka wykazała się umiejętnością opracowania zwięzłego, acz treściwego opisu zagadnień teoretycznych stanowiących wprowadzenie do tematyki pracy, właściwie określiła cel pracy i odpowiednio zaprojektowała zadania dla jego realizacji. Właściwie przeprowadziła dyskusję otrzymanych wyników w oparciu o dostępne, aktualne dane literaturowe oraz wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Wniosek końcowy:

Reasumując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami), dlatego też wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o

dopuszczenie mgr Aleksandry Orzoł do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się również do Wysokiej Rady WZP o wyróżnienie pracy mgr Aleksandry Orzoł p.t. „Wpływ leków weterynaryjnych na procesy metaboliczne siewek grochu siewnego (*Pisum sativum* L.) i łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)”, ze względu na:

1. szeroki zakres zagadnień, którymi zajęła się Doktorantka w swojej pracy wskazujący na Jej pracowitość i odwagę w podejmowaniu wyzwań naukowych;
2. znaczący, według mnie, wkład w poznanie mechanizmów oddziaływania antybiotyków na metabolizm roślin;
3. zwrócenie uwagi na możliwość usuwania antybiotyków ze ścieków i zaproponowanie właściwych metod;
4. opublikowanie wyników w impaktorowanych czasopismach o zasięgu światowym i osiągnięcie sumarycznego IF=5,7 (plus prace spoza dysertacji IF=1,617).

