SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO

Warszawa, 22.01.2025

Dr hab. Inż. Katarzyna Chwedorzewska prof. SGGW
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Botaniki
Nowoursynowska 166, 02-776 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdalena Krupka pt. „Reakcja ekofizjologiczna roślin na zanieczyszczenie środowiska antybiotykami”

Wykonanej pod opieką Pani profesor dr hab. Agnieszki Piotrowicz-Cieślak w Katedrze Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Podstawa prawna sporządzenia recenzji

Recenzja została sporządzona w związku z powołaniem mnie przez Wysoką Radę Naukową Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie na posiedzeniu w dniu 28 października 2024 do pełnienia funkcji recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych Pani mgr Magdalenie Krupce zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571 ze zm.)

Stwierdzam, że przedstawiony mi dokument jest kompletny i został przygotowany w sposób umożliwiający ocenę rozprawy i wydanie jednoznacznej opinii w sprawie nadania stopnia doktora nauk biologicznych, zgodnie z wymogami określonymi w Ustawie.

Otrzymałam: rozprawę doktorską w formie monotematycznego cyklu publikacji naukowych opatrzonego „Wprowadzeniem” składającym się ze „Streszczenia”, „Streszczenia anglojęzycznego”, „Wstępu”, „Hipotezy badawczej i celu pracy”, „Materiałów i metod badawczych”, „Prezentacji wybranych wyników oraz ich dyskusji”, „Podsumowania

i wniosków", „Bibliografii" i „Spisu tabel i rysunków" oraz kopie publikacji wchodzących w skład dzieła, jak i oświadczenia dotyczące procentowego udziału współautorów w opracowaniu tychże publikacji. Stwierdzam, że układ pracy Pani mgr Magdaleny Krupki jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań.

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Krupki przygotowana została jako cykl sześciu prac: jednej publikacji przeglądowej, czterech publikacji doświadczalnych oraz materiałów przygotowanych do opublikowania. Jedna praca ukazała się 2021, druga 2022, a trzy w 2024. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports o średnim i wysokim współczynniku wpływu (Impact Factor - IF) od 2,7 do 4,927. Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład dzieła jest bardzo wysoki i wynosi 19,024 (zgodnie z rokiem publikacji). Czasopisma te znajdują się również w „Wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych" Ministerstwa Edukacji i Nauki i według tego wykazu są punktowane od 70-140 punktów, a ich sumaryczna liczba punktów wynosi 550. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka jest pierwszą autorką wszystkich prac i jej wkład w ich powstanie jest bardzo wysoki i wynosi od 65% do 90%.

Według Web of Science (core collection) Doktorantka jest współautorką w sumie 9 artykułów naukowych cytowanych aż 149 razy, a jej Index Hirscha wynosi 3, tak więc jest osobą już rozpoznawalną w świecie naukowym.

Prace badawcze wchodzące w skład dzieła opatrzone zostały bardzo dobrze napisanym, syntetycznym „Wprowadzeniem", gdzie Doktorantka odwołując się do współczesnej literatury naukowej przedstawia całość zagadnienia, naświetla cele badawcze, stawia hipotezy, relacjonuje przebieg badań oraz podkreśla wagę uzyskanych przez siebie wyników. Ta część dzieła jest moim zdaniem bardzo ważna, gdyż spina w spójną całość uzyskane na kolejnych etapach pracy wyniki, które były publikowane w czasopismach o różnym profilu i wymaganiach. Publikacje wchodzące w skład dzieła zapewne zostały zmodyfikowane, żeby sprostać wymaganiom różnych redaktorów i recenzentów, więc jednolite ich podsumowanie jest jak najbardziej na miejscu.

Praca Pani magister Magdaleny Krupki skupia się na poważnym problemie środowiskowym generowanym przez chów zwierząt, zwłaszcza przemysłowy chów drobiu, jakim jest zanieczyszczenie środowiska, zarówno gleb jak i wód, antybiotykami. Związki te trafiają do środowiska wraz z obornikiem, wykorzystywanym w wielu uprawach jako nawóz. Doktorantka skupiła się na tetracyklinie, która ze względu na szerokie spektrum działania, niski koszt produkcji i łatwość podawania jest powszechnie stosowana w paszach. Jednak środek ten charakteryzuje się dużą trwałością, dobrą rozpuszczalnością, dużą mobilnością i może pozostawać w środowisku bardzo długo, wpływając negatywnie na różne organizmy zarówno rośliny jak i mikrobiom gleby oraz ryzosfery. Tetracyklina u roślin może upośledzać aparat fotosyntetyczny oddziaływując niekorzystnie na chloroplasty posiadające bakteryjne mechanizmy transkrypcji i translacji, może również degradować białka zaangażowane w syntezę chlorofilu i inne białka fotosyntetyczne. Antybiotyki ponadto mogą w tkankach rośliny być akumulowane, mogą również ulegać degradacji bądź być przekształcane, co wskazuje na potencjalne możliwości wykorzystania roślin w fitoremediacji, szczególnie w bardzo zanieczyszczonych środowiskach.

Doktorantka na potrzeby realizacji pracy sformułowała cztery cele szczegółowe:

1. Dostarczenie nowych danych dotyczących wpływu tetracykliny na aparat fotosyntetyczny, ze szczególnym uwzględnieniem biosyntezy chlorofilu i aktywności RuBisCO
2. Poszukiwania molekularnych i morfologicznych biomarkerów uszkodzeń i regeneracji roślin traktowanych tetracykliną
3. Optymalizacji metody izolacji DNA bakterii z filosfery roślin spożywanych na surowo
4. Zbadania składu mikroorganizmów zasiedlających glebę, ryzosferę i filosferę roślin uprawianych w środowisku zanieczyszczonym

Do osiągnięcia wyznaczonych celów i zweryfikowania hipotez badawczych Pani mgr Krupka zaplanowała cztery zadania badawcze, które konsekwentnie zrealizowała:

Pierwszym zadaniem badawczym było „określenie wpływu tetracykliny na aparat fotosyntetyczny roślin”. Realizacja tego zadania została opisana w ramach 4 publikacji. Uważam, że bardzo dobrym pomysłem było rozpoczęcie tej części artykułem przeglądowym,

dowodzącym tego, że Doktorantka zgłębiła temat i przeprowadziła rzetelną kwerendę przed przystąpieniem do właściwych badań. Wyniki kolejnych prac ujawniły, że rośliny (rzęsa drobna i groch uprawny) traktowane różnymi stężeniami tetracykliny charakteryzowały się znacznie niższą zawartością chlorofilu niż kontrola. Badania Doktorantki wykazały również niekorzystny wpływ tetracykliny na szlak biosyntezy chlorofilu u roślin uprawianych w warunkach laboratoryjnych, jak i w warunkach polowych, przejawiający się obniżeniem zawartości prekursora chlorofilu (kwasu aminolewulinowego) i obniżoną aktywnością dehydrogenazy kwasu aminolewulinowego. Również Doktorantka wykazała, że antybiotyk ten powoduje obniżenie aktywności RuBisCO oraz zmniejszenie zawartości dużej podjednostki tego enzymu.

Drugim zadaniem badawczym było „poszukiwanie morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych markerów uszkodzeń i regeneracji roślin traktowanych tetracykliną”. Doktorantka ujawniła szereg zmian morfologicznych wywołanych obecnością w środowisku tego antybiotyku zarówno u rzęsy drobnej, jak i grochu. Zaobserwowała ona również wzrost stężenia wolnych rodników w korzeniach rzęsy drobnej i wzrost aktywności systemu antyoksydacyjnego, przede wszystkim peroksydazy askorbinianowej, jak również wzrost zawartości białek opiekuńczy HSP70. Wnioskując, że akumulacja wolnych rodników może powodować uszkodzenia na poziomie komórkowym, zwróciła ona uwagę na stan błon komórkowych i mitochondriów. Zauważyła wzrost zawartości malondialdehydu po ekspozycji rzęsy drobnej na tetracyklinę, wskazujący na peroksydację lipidów i uszkodzenie błon komórkowych i stwierdziła również uszkodzenia mitochondriów. Tak zidentyfikowane markery Doktorantka wykorzystała do oceny roślin uprawianych na glebach bezpośrednio eksponowanych na odchody zwierząt karmionych paszą zawierającą tetracyklinę, oraz roślin wodnych uprawianych w wodzie zawierającej ekstrakt z obornika. Zarówno u grochu siewnego, jak i rzęsy drobnej zaobserwowała ona wzrost stężenia zarówno malondialdehydu jak i białek opiekuńczych HSP70, uszkodzenie mitochondriów i zahamowanie wzrostu roślin. Doktorantka zbadała również możliwości regeneracji u rzęsy drobnej. Po przeniesieniu na pożywkę bez antybiotyku rośliny zwiększały liczbę pędów, ich powierzchnię i suchą masę. Również poziom wolnych rodników w korzeniach uległ spadkowi. Zmniejszyło się też stężenie

malondialdehydu. Pani mgr Krupka powiązała te zjawiska ze wzmożoną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych i wzrostem poziomu białek harperonowych, jednak stwierdziła ona równolegle postępujące uszkodzenia mitochondriów. W tym zadaniu Doktorantka wskazała markery pozwalające monitorować zarówno proces uszkodzeń wywołanych przez tetracyklinę, jak i regeneracji roślin. Niewątpliwą zaletą tych badań jest ich aplikacyjność, gdyż uzyskane wyniki mogą być wykorzystane do monitoringu ekotoksyczności środowiska.

Kolejnym zadaniem było: „zbadanie składu mikroorganizmów zasiedlających glebę, ryzosferę i filosferę roślin uprawianych w środowisku zanieczyszczonym”. Doktorantka wykazała, że obecność tetracykliny w glebie znacząco zmienia skład jej mikrobiomu, co świadczy o wrażliwości niektórych taksonów na ten antybiotyk. W glebie tej zidentyfikowano ponadto groźny dla ludzi patogen *Mycobacterium tuberculosis*, który nie występował w próbie kontrolnej. Jednak badany mikrobiom ryzosfery sałaty rosnącej w glebie traktowanej tetracykliną w porównaniu z mikrobiomem glebowym okazał się znacznie mniej wrażliwy na ten antybiotyk, co Doktorantka zinterpretowała, jako obecność dodatkowych czynników, które mogą wpływać na skład taksonomiczny mikrobiomu ryzosfery. Uzyskane wyniki dowodzą, jasno, że wprowadzane do gleby wraz z obornikiem antybiotyki mogą prowadzić do trwałych zmian w mikrobiomie, co może mieć długoterminowe konsekwencje dla zdrowia ekosystemu glebowego, a tym samym dla kondycji uprawianych na niej roślin.

Kolejne zadanie badawcze miało charakter metodyczny i obejmowało „optymalizacje metody izolacji DNA bakterii z filosfery roślin”. Realizacja tego zadania dowodzi, że Pani mgr Magdalena Krupka jest dojrzałą badaczką, posługującą się bardzo sprawnie warsztatem badawczym, potrafiącą samodzielnie pokonać przeszkody jakie na swojej drodze napotkała. Rozwiązanie tego problemu moim zdaniem jest równie ważne jak realizacja pozostałych celów.

„Wprowadzenie” kończy 10 rozbudowanych wniosków, będących podsumowaniem pracy. Przyznaje, że bardzo podoba mi się taka forma prezentacji, ponieważ każdy wniosek jest opatrzony syntetycznym komentarzem. Moim zdaniem lepiej wyglądałoby umieszczenie na końcu wniosku ściśle metodycznego, a tym samym rozdzielenie go od części eksperymentalnej. Mam do „Wprowadzenia” drobne uwagi np. w podrozdziale 3.2.1.

„Parametry morfologiczne roślin" pojawia się cytowanie protokołu OECD (2006). Ja znalazłam w intrenecie, że jest to publikacja: Organisation for Economic Cooperation and Development, o której wzmianka powinna pojawić się również w spisie literatury, jak też powinno pojawić się rozszyfrowanie tego skrótu. Również w „autoreferacie" pojawiają się inne akronimy stosowanych procedur i związków chemicznych, które bez względu na to jak są powszechnie stosowane powinny być rozszyfrowane np.: WST-1 (water-soluble tetrazolium salt).

Podsumowując:

Rola recenzenta prac już opublikowanych szczególnie w dobrych czasopismach jest trudna, gdyż wszystkie one oprócz ostatniej przeszły już przez sito recenzenckie, zostały parokrotnie wnikliwie przeanalizowane, skomentowane i ocenione, tak więc moja powtórna ich ocena niewiele by wnosiła. Dlatego moja ocena dotyczy dysertacji jako całości. Uważam, że przedstawiony mi materiał stanowi logiczną i spójną całość, o bardzo wysokiej wartości naukowej, z mocnymi elementami aplikacyjnymi. „Wprowadzenie" dowodzi, że cykl badawczy został precyzyjnie zaprojektowany i konsekwentnie realizowany, gdzie absolutnie urzekła mnie dbałość Doktorantki o szczegóły takie jak graficzne przedstawienie realizacji zadań badawczych, czy niezwykle staranny spis literatury. Wrażenie na mnie zrobił również rozbudowany warsztat naukowy, gdzie Doktorantka swobodnie porusza się wśród zaawansowanych metod analitycznych i statystycznych.

Zarówno jako recenzentka jak i osoba zainteresowana szczególnie aspektem środowiskowym prezentowanych badań, chciałabym poruszyć parę kwestii i usłyszeć opinie Doktorantki na ten temat.

1. Jak długo tetracyklina pozostaje w glebie i jak typ gleby może wpływać na jej utrzymywanie się w środowisku i transport w głąb profilu glebowego. Czy proste rozwiązanie takie jak np. dłuższe przechowywanie na pryzmie obornika mogą realnie zmniejszyć zagrożenie zanieczyszczenia tetracykliną gleby nawożonej obornikiem.
2. Zabrakło mi trochę w przypadku badań mikrobiomu glebowego, jak i mikrobiomu ryzosfery oprócz podejścia jakościowego odniesienia się do aspektu ilościowego, czyli

jaki i czy tetracyklina wpływa na liczebność/biomasę tych mikroorganizmów i czy ma również wpływ na ich aktywność (wyrażaną oddychaniem glebowym).

3. Chciałabym również poznać opinię Doktoranki na temat wpływu antybiotyków na ekosystemy wodne. Czy jej zdaniem kontaminacja wód antybiotykami może prowadzić do zakłócenia obiegu materii w zanieczyszczonych wodach poprzez zubożenie społeczności odpowiedzialnych za rozkład martwej materii organicznej, prowadzić do gromadzenia się dużych ilości jej na dnach zbiorników (co może powodować deficyt tlenowy). Czy skala zanieczyszczenia tetracykliną jest za mała, aby powodować zmiany na poziomie ekosystemu.
4. Obecnie w Polsce obowiązują wytyczne normatywne, które zalecają badania gleby pod względem obecności pałeczek *Salmonella* oraz badania parazytologiczne dotyczące obecności jaj pasożytów jelitowych, rzadziej pojawiają się sugestie oznaczeń w glebie typowych przedstawicieli mikrobioty przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt (takich jak bakterie z grupy coli, czy bakterie przetrwalnikujących takie jak *Clostridium welchii*). Chciałabym zapytać, czy zdaniem Doktorantki stwierdzony przez nią w glebie traktowanej tetracykliną patogen *Mycobacterium tuberculosis*, którym można zakazić się przede wszystkim od osoby chorej, tj. „prątkującej", obecny w glebie rzeczywiście może stanowić realne zagrożenie dla zdrowia człowieka, a tym samym czy warto kontynuować ten wątek badawczy.
5. Bardzo zainteresowały mnie badania filosfery, niestety ograniczyły się one do opracowania skutecznych metod izolacji DNA, więc żywię nadzieje, że będą one przez Doktorantkę kontynuowane. Jako że antybiotyki są silnym czynnikiem selekcyjnym, mogą one znacząco wpływać na skład gatunkowy filosfery. Czy zdaniem doktorantki działanie tetracykliny obecnej w wodzie i glebie, na której rośnie roślina, jest na tyle silne, że może wpływać na skład gatunkowy filosfery i promować zasiedlanie jej przez szczepy antybiotykoodporne.
6. Jednocześnie bardzo chciałabym usłyszeć o dalszych planach badawczych Pani mgr Magdaleny Krupki, zabrakło mi tego akcentu na końcu „Wprowadzenia".

SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO

Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska zatytułowana „Reakcja ekofizjologiczna roślin na zanieczyszczenie środowiska antybiotykami" Pani mgr Magdaleny Krupki stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571 ze zm.), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie tejże ustawy.

W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Krupki, dopuszczenie jej do publicznej obrony i kontynuowanie czynności w ramach przewodu doktorskiego. Również ze względu na ponad przeciętny poziom merytoryczny przedstawionej pracy chciałabym rekomendować ją do wyróżnienia.

Profesor dr hab. inż. Katarzyna Chwedorzewska

Katarzyna Chwedorzewska