Słupsk, 24 stycznia 2025 r.

Prof. dr hab. inż. Aleksander Astel,
Zakład Chemii i Toksykologii Środowiska
Instytut Geografii
Uniwersytet Pomorski w Słupsku
ul. Arciszewskiego 22a, 76-200 Słupsk
tel. (+48 59) 8405-423,
e-mail: aleksander.astel@upsl.edu.pl

REZENCJA

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Magdaleny Krupki** zatytułowanej

REAKCJA EKOFIZJOLOGICZNA ROŚLIN NA ZANIECZYSZCZENIE ŚRODOWISKA ANTYBIOTYKAMI

1. Przedmiot recenzji

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska **mgr inż. Magdaleny Krupki** pt. **„Reakcja ekofizjologiczna roślin na zanieczyszczenie środowiska antybiotykami"** ubiegającej się o stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie biologia przed Radą Naukową Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Promotorem rozprawy doktorskiej jest **prof. dr. hab. Agnieszka Iwona Piotrowicz-Cieślak** z Katedry Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin Wydziału Biologii i Biotechnologii UWM.

2. Ocena bibliometryczna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opiera się na pięciu publikacjach, które opublikowano w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, indeksowanych w bazach Web of Science. Zestaw uzupełnia materiał przygotowany do kolejnej publikacji, który można ocenić jako gotowy manuskrypt. Wszystkie artykuły opublikowano w czasopismach ujętych w aktualnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów w zakresie od 70 do 140, oraz pięcioletnim współczynniku oddziaływania (ang.: *Impact Factor*) w zakresie od 2,700 do 4,927. Średnia punktacja opublikowanych artykułów wynosi 110 pkt., zaś średnia wartość pięcioletniego współczynnika oddziaływania IF wynosi 3,805. Sumaryczny pięcioletni współczynnik oddziaływania prac tworzących cykl wynosi 19,027 zaś sumaryczna punktacja wynosi 550 punktów. Pod względem wartości wskaźników bibliometrycznych przekazany do oceny cykl spójnych tematycznie artykułów tworzących rozprawę doktorską prezentuje się okazale i z całą pewnością uprawnia kandydatkę do ubiegania się o stopień doktora. We wszystkich przedstawionych artykułach **mgr inż. Magdalena Krupka** jest pierwszym autorem, przy czym do każdej z nich załączono oświadczenia innych współautorów. Analiza oświadczeń dowodzi, że w każdej pracy doktorantka miała wiodący wkład merytoryczny, który w więk-

szości przypadków dotyczył krytycznej analizy materiałów źródłowych, przygotowania planu badań w oparciu o zidentyfikowane teorie i koncepcje naukowe jak również wykonania szczegółowej analizy danych i przygotowania pierwotnej wersji manuskryptów. Nie dziwi fakt, że prace powstawały w formie opracowań wieloautorskich. Jest to obecnie powszechne i cenne, gdyż prowadzi do budowania relacji, sieci naukowych i znacząco ułatwia kontynuowanie rozwoju naukowego na jego dalszych etapach. Biorąc pod uwagę powyższe fakty można z całym przekonaniem uznać, że rozprawa doktorska **spełnia kryterium oparcia o kilka, spójnych merytorycznie publikacji naukowych, opublikowanych w indeksowanych, recenzowanych czasopismach**.

3. Cel pracy i ogólna ocena tematyki

Ogólna tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy jednego z ważniejszych obecnie problemów środowiskowych, którym jest zanieczyszczenie ekosystemów ksenobiotykami, których emisja wiąże się ściśle z działalnością człowieka. W rozprawie omówiono zagadnienie kompleksowej oceny wpływu tetracykliny na rośliny, zarówno z punktu widzenia ich odporności na zanieczyszczenie jak również pod względem możliwości ich wykorzystania w fitoremediacji. Biorąc pod uwagę wyzwania, które stoją przed cywilizacją, tematyka identyfikowania i opisywania mechanizmów odpowiedzi biologicznych organizmów na różne grupy substancji wydaje się być ze wszech miar aktualna i ważna. Wynika to z faktu, że wiele substancji, które trafiają do środowiska jest związanych głównie z działalnością człowieka i pomimo tego, że uwolnienie następuje z reguły na obszarach zamieszkanych, mogą rozprzestrzeniać się one poprzez cykl hydrologiczny i trans regionalny transport zanieczyszczeń na tereny, w których w chwili obecnej presja antropogeniczna jest znikoma. Antybiotyki, do których należy tetracyklina stanowią taką właśnie grupę kseniobiotyków. Obecność antybiotyków w środowisku jest wynikiem wielu czynników. Do głównych zalicza się powszechne stosowanie oraz niepełny metabolizm w organizmach. W przypadku tetracykliny, szerokie spektrum działania połączone ze stosunkowo niskimi kosztami sprawiły, że stosuje się ją powszechnie w produkcji zwierzęcej, w której jednym ze sposobów stosowania obiegów zamkniętych w gospodarce jest wykorzystanie obornika zwierzęcego w nawożeniu. Tym samym tetracyklina trafia do środowiska w sposób niekontrolowany i może stanowić potencjalne zagrożenie dla organizmów zarówno roślinnych jak i zwierzęcych.

Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej autorka uzupełniła o kilkudziesięciu stronicowy opis skrócony, którego głównym celem było przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat wpływu tetracykliny na rośliny a przede wszystkim opisanie obszarów, w których aktualny stan wiedzy jest niepełny i fragmentaryczny. Po zidentyfikowaniu braków w obecnym stanie wiedzy o wpływie tetracykliny na rośliny doktorantka precyzyjnie określiła cele rozprawy doktorskiej, do których zaliczyła: dostarczenie nowych danych dotyczących wpływu tetracykliny na aparat fotosyntetyczny, ze szczególnym uwzględnieniem biosyntezy chlorofilu i aktywności karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCo), poszukiwanie molekularnych i morfologicznych biomarkerów uszkodzeń i regeneracji roślin eksponowanych na tetracyklinę, optymalizację metody izolacji DNA bakterii z filosfery roślin spożywanych na surowo oraz zbadanie składu mikroorganizmów zasiedlających glebę, ryzosferę i filosferę roślin uprawianych w środowisku zanieczyszczonym. Doktorantka jasno sprecyzowała hipotezy badawcze, którymi były następujące założenia: (i) tetracyklina negatywnie wpływa na aparat fotosyntetyczny roślin, zmniejszając aktywność RuBisCO oraz zaburzając biosyntezę chlorofilu, (ii) parametry morfologiczne, zawartość białek szoku cieplnego (HSP70), aktywność enzymów antyoksydacyjnych, uszkodzenia błon komórkowych oraz mitochondriów są biomarkerami zarówno uszkodzenia jak i regeneracji roślin traktowanych tetracykliną, (iii) rośliny wykazują zdolność do regeneracji po trakto-

waniu tetracykliną, (iv) optymalizacja metody izolacji DNA bakterii z filosfery roślin zwiększa ilość i poprawia jakość uzyskiwanego materiału genetycznego, (v) środowiskowe stężenia tetracykliny znacząco zmieniają mikrobiom gleby i ryzosfery sałaty uprawianej w zanieczyszczonej glebie. Weryfikację hipotez podzielono na zadania, a te z kolei, w sposób przejrzysty zaadresowano kolejnymi publikacjami. W ujęciu ogólnym tematykę i cel określono w odniesieniu do krytycznej oceny aktualnego stanu wiedzy zaś hipotezy i założenia badawcze przygotowano precyzyjnie i w sposób przemyślany. Drobną wątpliwość budzi chyba zbyt szeroko sprecyzowany tytuł rozprawy, gdyż w badaniach nie analizowano wpływu szeregu antybiotyków lecz koncentrowano się na jednym. Wydaje się zatem, że tytuł powinien brzmieć **Reakcja ekofizjologiczna roślin na zanieczyszczenie środowiska tetracykliną.** Dodatkowo, w opisach naukowych nie powinno stosować się określenia „traktowanie roślin", lecz „eksponowanie roślin na działanie stresora".

4. Ocena merytoryczna

Na podstawie opisów przedstawionych w sekcjach Materiały i Metody poszczególnych publikacji (tylko tych, w których te sekcje występują) z całym przekonaniem można stwierdzić, że autorka zastosowała w badaniach niezwykle szerokie spektrum oznaczeń (począwszy od parametrów morfologicznych roślin, izolację i pomiar chlorofilu, mitochondriów, identyfikację wolnych rodników i błon komórkowych, oznaczanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych i dehydrogenazy mitochondrialnej, zawartości malondialdehydu, jonów azotanowych (V) i (III) i szeregu innych) i związanych z nimi metod analitycznych. Można stwierdzić również, że do testowania hipotez badawczych wykorzystano metody, które w chwili obecnej stanowią state-of-the-art w badaniach roślin a dodatkowo, z dużym prawdopodobieństwem, można stwierdzić, że doktorantka nabyła szerokiej wiedzy o warsztacie laboratoryjnym, nawet jeśli nie wszystkie oznaczenia wykonała samodzielnie, na co wskazują prace publikowane w modelu wieloautorskim. Uzyskane wyniki empiryczne analizowano z wykorzystaniem z reguły poprawnych metod statystycznych, choć nie we wszystkich publikacjach opisano dokładnie jakie to są metody i czy kryteria stosowalności tych metod w każdym przypadku były spełnione. Przykładowo, w publikacji 2 zupełnie pominięto sekcję Materials and Methods. Korzystając z okazji proszę doktorantkę o uzupełnienie tych informacji w trakcie obrony.

W publikacjach 1-4 autorka określała wpływ tetracykliny na aparat fotosyntetyczny roślin. Badania rozpoczęła od przeglądu literatury, który wykazał braki w aktualnym stanie wiedzy a w szczególności brak wyjaśnienia wpływu tetracykliny na biosyntezę chlorofilu oraz na aktywność enzymów niezbędnych do procesu fotosyntezy. Aby wypełnić tę lukę doktorantka realizowała doświadczenia z rzęsą wodną i grochem, które odpowiednio uprawiano na pożywkach z określonym dodatkiem tetracykliny, glebie zanieczyszczonej znaną ilością antybiotyku oraz tej, pobranej z obszarów sąsiadujących z fermami drobiu. W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia tetracykliny spada zawartość chlorofilu w roślinach, co generalnie potwierdza negatywne oddziaływanie ksenobiotyku na mechanizm fotosyntetyczny. Korzystając z okazji dyskusji z doktorantką chciałbym zapytać jakie kryterium zastosowano w wyborze poziomów stężenia tetracykliny w kolejnych wariantach skażonych pożywek lub gleb, czy wybrane stężenia tetracykliny korespondują ze stężeniami w próbkach środowiskowych (woda, gleba) pochodzących z terenów, które nie sąsiadują z terenami intensywnej hodowli oraz jak doktorantka tłumaczy raczej liniowy spadek zawartości chlorofilu w zestawieniu z wyraźnie ekspotencjalnym wzrostem stężenia tetracykliny w pożywce lub glebie doświadczalnej? W rezultacie przeprowadzonych badań ustalono, że tetracyklina może zaburzać kluczowe etapy szlaku biosyntezy chlorofilu (obniżenie poziomu kwasu amino lewulinowego w uprawach grochu)

co negatywnie wpływa na zdolności fotosyntetyczne roślin. Cennym elementem nowości naukowej realizowanych eksperymentów były badania nad wpływem tetracykliny na enzym RuBisCo, w których wykazano, że antybiotyk powoduje zmniejszenie zawartości dużej podjednostki RuBisCo w liściach grochu w wartościach zmiennych ekspotencjalnie i korespondujących z ekspotencjalnym wzrostem stężenia w glebie. W tym miejscu prosiłbym ponownie o kilka słów dodatkowego komentarza o tym jak doktorantka tłumaczy ekspotencjalne zmiany zawartości dużej podjednostki RuBisCo skorelowane z raczej liniowym spadkiem aktywności tego enzymu?

Kolejnym wątkiem badawczym podjętym przez doktorantkę było poszukiwanie morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych markerów uszkodzeń i regeneracji roślin eksponowanych na tetracyklinę. Ten wątek poruszono w publikacjach 2-4. Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka wykazała, że toksyczność tetracykliny przejawia się zmniejszeniem liczby roślin, powierzchni zredukowanych pędów oraz świeżej masy u rzęsy, oraz skróceniem korzenia, łodygi i zmniejszeniem powierzchni liścia u grochu. W badaniach analizowano zmienność parametrów systemu antyoksydacyjnego (np. zmiany aktywności peroksydazy askorbinianowej i aktywność katalazy) i wykazano w nich występowanie mechanizmu, który aktywuje komórkowe markery stresu wywołanego tetracykliną. Wyniki badań opisywano z reguły w sposób przemyślany i logicznie spójny, lecz w kilku przypadkach zabrakło precyzyjnych określeń ilościowych, np. wyrażonych w % skali efektu. Przytaczanie stwierdzeń o znaczącym lub znikomym efekcie wydaje się niezbyt precyzyjne a ocena danego terminu zależy od skali, którą przyjmuje się w danym momencie. Jednym z elementów nowości tego wątku badań było powiązanie zmian stężenia jonów azotanowych będących markerem uszkodzeń błon komórkowych w roślinach eksponowanych na tetracyklinę i o ile samo wnioskowanie nie budzi większych zastrzeżeń o tyle stosowana nomenklatura w polskojęzycznym streszczeniu naukowym powinna zostać skorygowana. Nie używa się obecnie terminów „azotany" i „azotyny" lecz jony azotanowe (V) i (III). Korzystając z okazji możliwej dyskusji z doktorantką chciałbym zapytać, czy odzyskanie zdolności do kontynuowania wzrostu przez rośliny po zakończeniu ekspozycji na tetracyklinę jest procesem trwałym i stabilnym, szczególnie w warunkach stwierdzonych uszkodzeń mitochondriów? Dodatkowo, czy konstrukcja eksperymentu, w którym wyraźnie rozdziela się fazę ekspozycji od fazy regeneracji symuluje faktyczne warunki środowiskowe? Wydaje się bowiem, że w przypadku rozważania potencjalnego zastosowania roślin w fitoremediacji nie dojdzie do wyraźnego rozdzielenia faz ekspozycji i regeneracji i eksperyment, w którym w fazie ekspozycji stężenie rośnie zaś w fazie regeneracji maleje byłby bardziej precyzyjnym zasymulowaniem rzeczywistych warunków środowiskowych. Bardzo proszę doktorantkę o komentarz w odniesieniu do wyżej opisanych punktów dyskusyjnych.

Istotnym elementem nowości naukowej rozprawy doktorskiej, który znacząco uzupełnia aktualny stan wiedzy i wskazuje kierunki optymalnych procedur laboratoryjnych były badania nad optymalizacją metody izolacji DNA bakterii z filosfery roślin. W oparciu o szczegółową analizę 50 protokołów izolacji DNA z liści dokonano wariantowej optymalizacji parametrów przygotowania próbek na podstawie eksperymentu przeprowadzonego z wykorzystaniem 24 różnych kombinacji technik. W efekcie zapropnowano protokół, który umożliwił uzyskanie wysokiej specyficzności i skuteczności izolacji DNA (99.8% DNA przypisano dla królestwa bakterii) co dowodzi przydatności metody w badaniach molekularnych. Jednakże, korzystając z okazji chciałbym zapytać na jakiej podstawie zdecydowano o tym, że warianty eksperymentu prowadzono z naważką jedynie 5 i 50 g liści i dlaczego nie zastosowano innych wariantów naważek, jak również dlaczego nie podjęto próby zastosowania algorytmów wielowymiarowej optymalizacji? Czy w opinii doktorantki zastosowanie optymalizacji algorytmicznej, której efektem mogłoby być uzyskanie protokołu uwzględniającego konieczno-

ści stosowania mniejszej nawaźki a tym samym zredukowanie zapotrzebowania na odczynniki lub długość procesów jednostkowych byłoby podejściem pożądanym? Możliwe, że jest to pole do dalszych analiz w ramach potencjalnych, kolejnych etapów rozwoju naukowego doktorantki.

W materiale będącym podstawą publikacji 5 i manuskrypcie przygotowanym do złożenia doktorantka dokonała analizy składu mikroorganizmów roślin uprawianych z zanieczyszczonym środowisku wskazując na zmiany mikrobiomu gleby i ryzosfery sałaty wynikające z wprowadzenia do gleby tetracykliny lub prowadzenia uprawy na glebie zanieczyszczonej. W rezultacie przedstawiono szczegółową dyskusję wyników z uwzględnieniem określenia bakteryjnego składu procentowego odpowiednich mikrobiomów lecz bardzo istotnym wątkiem, który zdecydowanie wymaga dodatkowego komentarza w trakcie obrony jest wykrycie w glebie traktowanej tetracykliną patogenu wywołującego gruźlicę, którego nie wykryto w próbkach kontrolnych. Jak doktorantka tłumaczy to zjawisko? Czy wprowadzenie antybiotyku powinno zwiększać szanse przeżywania w glebie patogenów chorobotwórczych czy je obniżać? Dodatkowo pragnę zapytać, dlaczego w badaniach wykorzystano rośliny o dużym znaczeniu komercyjnym a odstąpiono od badań nad roślinami, które można stosować w fitoremediacji?

5. Wnioski końcowe

Na podstawie analizy publikacji tworzących cykl rozprawy doktorskiej **mgr inż. Magdaleny Krupki** oraz ich wartości naukowej z całą pewnością można stwierdzić, że cel rozprawy został osiągnięty.

W efekcie realizacji badań i analizy wyników będących podstawą rozprawy doktorskiej **mgr inż. Magdaleny Krupki** sformułowano szereg cennych naukowo wniosków. Do najważniejszych, w mojej ocenie należą: (i) tetracyklina wywiera toksyczny wpływ na aparat fotosyntetyczny roślin, zaburzając szlak biosyntezy chlorofilu oraz aktywność kluczowych enzymów, takich jak karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO) i dehydrataza kwasu aminolewulinowego (ALAD), które można wykorzystać jako markery ekotoksykologiczne, (ii) w badaniach nad skalą oddziaływania toksycznego u roślin można uzyskiwać wyniki bardziej wiarygodne, poprzez modyfikację czasu pomiaru aktywności enzymatycznej i protokołów izolacji DNA, (iii) rośliny wykazują zdolności do regeneracji po obniżeniu intensywności skali oddziaływania stresora, choć badania w tym zakresie powinny w większym stopniu symulować rzeczywiste warunki środowiskowe, (iv) mikrobom glebowy i roślinny ulega modyfikacji w kontakcie z tetracykliną, choć pojawianie się groźnych patogenów chorobotwórczych w glebie testowanej i ich brak w glebie kontrolnej powinno być przedmiotem wnikliwej analizy a formułowanie wniosków możliwe dopiero po wyjaśnieniu przyczyn obecności patogenów w glebie z dodatkiem antybiotyków.

Niemniej jednak wnioski sformułowane przez doktorantkę przyczyniają się w istotny sposób do uzupełnienia luk w aktualnym stanie wiedzy i jednoznacznie wskazują kolejne obszary, w których uzupełnienie wiedzy jest pożądane.

Podsumowując, z całym przekonaniem uważam, że treść rozprawy doktorskiej kwalifikuje kandydatkę do ubiegania się o stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne i **dlatego, na podstawie art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571 ze zm.), wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Krupki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

24 stycznia 2025 r.

Kierownik
Zakładu [illegible] i Toksykologii Środowiska
prof. dr hab. inż. Aleksander Astel