Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 23.01.2025

WYDZIAŁ BIOLOGII UNIWERSYTETU GDAŃSKIEGO
Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
dr hab. Anna Aksmann, prof UG

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Krupki
pt. „Reakcja ekofizjologiczna roślin na zanieczyszczenie antybiotykami"
Promotor: Pani prof. dr hab. Agnieszka Iwona Piotrowicz-Cieślak

Niniejsza recenzja sporządzona została w odpowiedzi na pismo z 28.11.2024, przesłane przez Przewodniczącą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Panią prof. dr hab. Ninę Smolińską, informujące o wyznaczeniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Krupki, pt. „Reakcja ekofizjologiczna roślin na zanieczyszczenie antybiotykami".

Ogólna ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Krupki pt. „Reakcja ekofizjologiczna roślin na zanieczyszczenie antybiotykami" wykonana została w Katedrze Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Promotorem pracy jest Pani prof. dr hab. Agnieszka Piotrowicz – Cieślak. Rozprawa składa się z pięciu spójnych tematycznie prac opublikowanych w latach 2021-2024 (IF=19,027) oraz nieopublikowanego jeszcze manuskryptu. Prace te zostały opatrzone przez Doktorantkę streszczeniem, abstraktem w języku angielskim, wstępem, wyjaśnieniem głównych celów pracy, koncepcji badań i hipotez badawczych, omówione zostały też krótko materiały i metody badawcze, a następnie przedstawione zostały najważniejsze wyniki badań i płynące z nich wnioski. Do każdej z opublikowanych prac dołączono oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie poszczególnych publikacji. Z oświadczeń tych wynika, że w każdej z prac Doktorantka odgrywała wiodącą rolę, w każdej z nich jest ona też pierwszym autorem.

Niewątpliwymi atutami rozpatrywanej rozprawy doktorskiej są: wielowątkowość badań, szeroki wachlarz stosowanych technik i metod badawczych, a przede wszystkim aktualna, dobrze uzasadniona tematyka badań dotycząca wpływu antybiotyków – głównie tetracykliny – na rośliny, które jako organizmy niedocelowe narażone są na obecne w środowisku zanieczyszczenia farmaceutyczne. Jest to problem nie tylko zaprzątający uwagę naukowców, ale również istotny społecznie, gdyż działalność człowieka przyczynia się do wzrastającego zanieczyszczenia środowiska substancjami biologicznie czynnymi, wśród których rosnącą uwagę poświęca się antybiotykom.

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
tel. +48 58 523 60 84
e-mail: anna.aksmann@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 59 B/209
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl

Gdańsk, 23.01.2025

Antybiotyki kojarzone są przede wszystkim z problemem lekooporności bakterii, jednak coraz więcej doniesień literaturowych wskazuje, że niebezpieczeństwo związane z obecnością tych substancji w środowisku ma o wiele szerszy kontekst. Jako że antybiotyki produkowane są z myślą o zastosowaniach medycznych i weterynaryjnych, ich wpływ na ssaki jest dobrze poznany, z kolei wiedza na temat wpływu antybiotyków na rośliny jest bardzo ograniczona. Z tego względu badania przeprowadzone przez Doktorantkę wnoszą istotny wkład naukowy we współczesny stan wiedzy z zakresu ekotoksykologii, fizjologii, biochemii i genetyki roślin narażonych na kontakt z antybiotykami oraz stanowią **znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne**. Ponadto przedstawione do oceny prace wskazują nie tylko na konsekwentne planowanie i realizowanie zadań badawczych przez Doktorantkę, ale również na jej rozwój naukowy.

Uwagi szczegółowe dotyczące rozprawy doktorskiej

Podczas realizacji swojej pracy doktorskiej Pani mgr inż. Krupka postawiła sobie za główny cel zbadanie wpływu jednego z powszechnie stosowanych antybiotyków – tetracykliny – na parametry fizjologiczne i biochemiczne roślin oraz ich mikrobiom. Ten ostatni element badań warty jest podkreślenia, ponieważ dane takie są w literaturze przedmiotu rzadkie. Równie wartościowa jest próba oszacowania możliwości adaptacyjnych roślin do stresu wywołanego działaniem tetracykliny oraz ich zdolności do regeneracji i powrotu do prawidłowego stanu fizjologicznego po ustaniu tego stresu. Aby zrealizować tenże cel Doktorantka wyznaczyła sobie konkretne zadania badawcze: (1) określenie wpływu tetracykliny na aparat fotosyntetyczny roślin, (2) wyznaczenie morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych zmian zachodzących w roślinach traktowanych tetracykliną, które mogłyby służyć jako markery uszkodzeń i regeneracji badanych organizmów, (3) zoptymalizowanie metody izolacji DNA bakterii wchodzących w skład mikrobiomu roślin oraz (4) analizę tegoż mikrobiomu u roślin rosnących w warunkach optymalnych i uprawianych w środowisku zanieczyszczonym. Wyniki realizacji zadań badawczych opublikowane zostały w postaci serii spójnych tematycznie publikacji oraz zawarte w manuskrypcie przygotowywanym do druku.

Praca przeglądowa Krupka i wsp. (2022) *Effects of antibiotics on the photosynthetic apparatus of plants.* (J. Plant Interact., doi: 10.1080/17429145.2021.2014579) (**PRACA 1**) stanowi teoretyczne wprowadzenie w tematykę badań. W pracy tej Doktorantka dokonała przeglądu literatury, ze szczególnym uwzględnieniem danych dotyczących wpływu tetracykliny na aparat fotosyntetyczny roślin. Zwróciła tutaj uwagę, że dostępne wyniki badań są mocno niekompletne i nie obejmują wielu istotnych aspektów funkcjonowania fotoautotrofów, choćby takich jak wpływ tetracykliny na biosyntezę chlorofilu czy aktywność enzymów związanych z przebiegiem fotostyntezy. Wnioski te stały się podstawą do zaplanowania badań, które mogłyby uzupełnić i wzbogacić istniejące już dane naukowe.

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
tel. +48 58 523 60 84
e-mail: anna.aksmann@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 59 B/209
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl

Gdańsk, 23.01.2025

Pierwsza seria badań prowadzonych przez Doktorantkę została opublikowana w pracy Krupka i wsp. (2021) pt. *Physiological and biochemical parameters of common duckweed Lemna minor after the exposure to tetracycline and the recovery from this stress*. (Molecules 2021, doi: 10.3390/molecules26226765) (**PRACA 2**). Niewątpliwą zaletą tych badań są: (a) układ doświadczalny, w którym uwzględniono nie tylko szkodliwy wpływ tetracykliny na procesy życiowe rzęsy drobnej, organizmu uznawanego za modelowy w tego typu badaniach, ale również odwracalność skutków stresu po jego ustąpieniu (faza „recovery"); (b) wieloaspektowość zaplanowanych analiz umożliwiających kompleksowe spojrzenie na funkcjonowanie rośliny narażonej na stres wywołany działaniem tetracykliny.

Pierwszym z analizowanych parametrów było zahamowanie wzrostu populacji *Lemna minor* traktowanej tetracykliną, co jest zgodne z wytycznymi protokołu OECD (Guidelines for the testing of chemicals: Lemna sp. Growth Inhibition Test) z 2006 roku, na który powołuje się Doktorantka. Wyniki pomiarów liczby członów pędowych, ich powierzchni, suchej i świeżej masy zostały przedstawione na Wykresie 1 w ww. pracy, a wyliczone na tej podstawie wartości EC50 w Tabeli 1, tamże. I właśnie wartości EC dotyczy moja pierwsza uwaga oraz pytanie do Doktorantki. W PRACY 2, w rozdziale 2.1 zawarte jest stwierdzenie, iż parametr EC50 jest stosowany głównie w badaniach dotyczących zwierząt. Trudno mi się zgodzić z tym stwierdzeniem – parametr EC (*effective concentration*) jest w równym stopniu wykorzystywany w badaniach nad roślinami i zwierzętami, zresztą jest to podstawowy parametr toksyczności w cytowanym przez Doktorantkę protokole OECD, dotyczącym przecież organizmu roślinnego. Chciałabym poprosić Panią mgr inż. Krupkę o kilka słów komentarza w tej sprawie. Drugie moje pytanie dotyczy samego sposobu wyznaczania przedstawionych wartości EC50. Istnieje kilka sposobów liczenia wartości EC; w samym protokole OECD proponuje się kilka podejść do tego zagadnienia. Niestety, w rozpatrywanej publikacji Doktorantka nie przedstawiła ani uzyskiwanych poprzez analizę regresji krzywych zależności stopnia inhibicji wzrostu od stosowanego stężenia (tzw. dose-response relationship, opisane np. w pracy Christensen, E. R., Kusk, K. O., & Nyholm, N. (2009). *Dose–response regressions for algal growth and similar continuous endpoints: calculation of effective concentrations*. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 28(4), 826-835), ani w ogóle sposobu liczenia wartości EC. Dość trudno jest mi porównać wspomniany Wykres 1 z wartościami przedstawionymi w Tabeli 1, ponieważ wartości EC z założenia liczy się z danych przedstawionych w procentach (zarówno wg norm OECD, jak i ISO), podczas gdy na Wykresie 1a,b,c mamy wartości bezwzględne. Z kolei Wykres 1d wskazuje, iż sucha masa uzyskiwana dla poszczególnych wariantów doświadczalnych, zarówno w fazie „exposure", jak i fazie „recovery", była porównywalna, podczas gdy EC50 dla tych faz (Tabela 1) różni się dwukrotnie. Ta sama uwaga dotyczy wyników opisujących aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Wykres 4, Tabela 3); na Wykresie 4 trudno jest dostrzec wyraźną zależność zmian wartości parametrów od

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
tel. +48 58 523 60 84
e-mail: anna.aksmann@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 59 B/209
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl

stężenia tetracykliny (sama Autorka pracy wskazuje w dyskusji, iż nie widać jasnej zależności pomiędzy aktywnością enzymów, a stężeniem antybiotyku), nie sposób zatem domyślić się, w jaki sposób wyliczono wartości EC. Podanie takich danych jest, według mnie, bardzo istotne, gdyż otrzymywane wartości EC mogą się różnić w zależności od zastosowanego modelu dopasowania krzywej oraz sposobu liczenia (zostało to opisane np. w: Noel, Z. A., Wang, J., & Chilvers, M. I. (2018). *Significant influence of EC50 estimation by model choice and EC50 type*. Plant Disease, 102(4), 708-714). Bardzo zatem proszę, aby podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej Doktorantka przedstawiła wykresy krzywych, z których liczone były parametry EC oraz sposób wykonywania obliczeń.

Ciekawym wynikiem opisanym w rozpatrywanej publikacji był wzrost suchej masy roślin traktowanych wysokimi stężeniami tetracykliny. Doktorantka tłumaczy go zmniejszeniem uwodnienia tkanek wskutek zaburzeń pobierania wody, co jest powszechnie przyjmowanym wytłumaczeniem tego typu obserwacji. Jednak Pani mgr inż. Krupka zasugerowała też inną możliwą przyczynę tego stanu rzeczy, a mianowicie zwiększenie sztywności („rigidity") ścian komórkowych. Jest to ciekawa i raczej niespotykana interpretacja, której jednak Doktorantka nie rozwinęła. Bardzo liczę na kilka słów komentarza na temat wpływu sztywności ścian komórkowych na suchą masę analizowanych roślin, tym bardziej, że Doktorantka stwierdza, iż sucha masa roślin w największym zakresie podlegała poprawie w fazie „recovery" (ostatnie zdanie rozdziału 2.1).

W omawianej pracy dużo uwagi poświęcone zostało problemowi stresu oksydacyjnego, co uważam za bardzo trafne, ponieważ uważa się, iż u podstaw większości stresów antropogenicznych, w tym wywołanych zanieczyszczeniami farmaceutycznymi, leży nadprodukcja reaktywnych form tlenu (RFT), co zostało też potwierdzone analizą obecności RFT w korzeniach rzęsy eksponowanej na tetracyklinę (Rysunek 3 w PRACY 2). Aby oszacować stopień narażenia roślin na stres oksydacyjny wywołany działaniem tetracykliny oraz możliwości adaptacyjne *L. minor* do tego stresu, Doktorantka przeprowadziła szereg badań aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych oraz poziomu markerów uszkodzeń komórki, takich jak np. poziom dialdehydu malonowego (MDA). Co prawda nie udało się zaobserwować jasnego wzorca zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na działanie tetracykliny, jednak wykazano istotną rolę tych enzymów w procesie odzyskiwania funkcjonalności komórek po ustaniu stresu (faza „recovery"). Logicznym uzupełnieniem tych badań jest analiza oksydacyjnych uszkodzeń komórki w fazie ekspozycji („exposure") na antybiotyk oraz fazie następującej po ustaniu stresu („recovery"). Typowym markerem takich uszkodzeń jest poziom MDA i tu wyniki uzyskane przez Doktorantkę jasno wskazują, że tetracyklina co prawda prowokuje uszkodzenia błon lipidowych badanego organizmu, jednak efekt ten nie utrzymuje się po ustaniu stresu. Aby dodatkowo wzmocnić wnioski dotyczące uszkodzenia błon w komórkach eksponowanych na tetracyklinę, Doktorantka postanowiła zbadać ich

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
tel. +48 58 523 60 84
e-mail: anna.aksmann@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 59 B/209
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl

integralność, co samo w sobie jest założeniem słusznym. Tu jednak pojawia się moja kolejna prośba do Doktorantki o kilka słów wyjaśnienia. Otóż z tekstu PRACY 2 oraz Wykresu 5 wynika, że jako wskaźnik integralności błon posłużyło oznaczenie stężenia azotanów/azotynów we frakcji izolowanych błon plazmatycznych. Oznaczanie stężenia azotanów/azotynów stosuje się standardowo w celu oszacowania wydajności produkcji tlenku azotu (NO) przez komórki, ponieważ nietrwały NO w zetknięciu z tlenem szybko ulega konwersji do dużo stabilniejszych form jonowych. Ponieważ – jak słusznie zauważa Doktorantka w PRACY 2 – produkcja NO może zmieniać się w warunkach stresowych prowadząc do nadprodukcji Reaktywnych Form Azotu (RFA), badanie stężenia azotanów/azotynów może być markerem stresu. Jednakże NO w komórkach roślinnych powstaje w tak wielu przedziałach komórkowych i na tak wiele sposobów (opisano to choćby w cytowanej przez Doktorantkę pozycji 61), że nie jest dla mnie jasne, dlaczego do oznaczeń użyto tylko izolowanej frakcji błonowej, a nie sprawdzono pod tym kątem supernatantu uzyskanego z homogenatu całych komórek. W pracy nie zostało również wyjaśnione, dlaczego stężenie azotanów/azotynów we frakcji błonowej miałoby być wiarygodnym wskaźnikiem integralności błon – sama homogenizacja powoduje ich uszkodzenie, a procedura frakcjonowania jest tak wieloetapowa, że trudno w zasadzie wykazać, iż wynik końcowy tego oznaczenia nie jest artefaktem. Być może dlatego w literaturze przedmiotu (przynajmniej tej, do której udało mi się dotrzeć) oznaczanie azotanów/azotynów stosuje się nie jako wskaźnik integralności błon plazmatycznych, ale jako ogólny wskaźnik zaburzeń produkcji NO w warunkach stresowych (wskaźnik stresu nitrozacyjnego) i oznacza jego stężenie w płynach ustrojowych (zwierzęta), medium hodowlanym (hodowle tkankowe roślinne i zwierzęce na podłożach „niskoazotowych") lub supernatantach uzyskanych z homogenatów tkanek/komórek roślin i zwierząt. Z drugiej strony, obserwacja, że stężenie azotanów/azotynów we frakcji błon izolowanych z roślin traktowanych najwyższym stężeniem tetracykliny jest istotnie większe od pozostałych wariantów doświadczalnych jest intrygująca. Liczę, że podczas obrony rozprawy doktorskiej będę miała okazję przedyskutować z Doktorantką poruszone wyżej kwestie.

Badając efekty działania tetracykliny na rośliny Doktorantka wzięła oczywiście pod uwagę zmiany zachodzące w organellach odpowiedzialnych za energetykę komórki. Na podkreślenie zasługuje tutaj fakt, że nie poprzestała na wykazaniu, że antybiotyk wpływa na chloroplast redukując znacząco ilość chlorofilu w badanych roślinach, ale wzięła też pod uwagę funkcjonowanie mitochondriów, co przez wielu badaczy organizmów fotoautotroficznych jest pomijane. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są wartościowym uzupełnieniem nielicznych jak dotąd danych literaturowych na temat toksycznego wpływu substancji leczniczych na mitochondria roślinne i ogólnie procesy oddechowe roślin, tym bardziej, że zmiany te wydają się być praktycznie nieodwracalne.

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
tel. +48 58 523 60 84
e-mail: anna.aksmann@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 59 B/209
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl

Gdańsk, 23.01.2025

Na podstawie wieloaspektowego spojrzenia na funkcjonowanie rośliny, zaprezentowanego w omówionej powyżej pracy, Doktorantka wybrała dalszy kierunek swoich badań, postanawiając przeanalizować bardziej szczegółowo wpływ tetracykliny na procesy fotosyntetyczne (**PRACA 3,** Krupka i wsp. *Critical stages in pea photosynthesis impaired by tetracycline as an environmental contaminant.* J Plant Res. 2024 doi: 10.1007/s10265024-01580-x.). Osobiście jestem trochę zawiedziona, że Pani mgr inż. Krupka nie zdecydowała się przyjrzeć bliżej ciekawie zapowiadającemu się problemowi wpływu antybiotyku na aktywność mitochondriów, jednak słabo poznany wpływ tetracykliny na fotosyntezę w pełni uzasadnia wybór dokonany przez Doktorantkę – u fotoautotrofów fotosynteza zawsze wysuwa się na pierwszy plan. Zauważyć także należy, że planując badania opisane w PRACY 3 Doktorantka postanowiła zmienić obiekt badań na roślinę lądową – groch zwyczajny (*Pisum sativum* L.), co wymusiło również zmianę sposobu prowadzenia hodowli oraz aplikacji antybiotyku. Z jednej strony utrudnia to porównanie wyników uzyskanych w PRACACH 2 i 3, z drugiej jednak pozwoliło wykazać, że tetracyklina działa niekorzystnie nie tylko na rośliny wodne, kontaktujące się ze skażonym środowiskiem korzeniami i dolną powierzchnią liści, ale także na rośliny mające poprzez korzenie kontakt ze skażoną glebą. Opisane w PRACY 3 wyniki wyraźnie wskazują, iż obecna w glebie tetracyklina ma niekorzystny wpływ zarówno na wzrost korzeni, jak i pędów, nie mających bezpośredniej styczności z antybiotykiem. Jednym z objawów fitotoksyczności tetracykliny było, podobnie jak w przypadku rzęsy drobnej, obniżenie zawartości chlorofilu w roślinach grochu traktowanych tym związkiem. Spadek zawartości chlorofilu w roślinie poddanej stresowi może, jak słusznie zauważa Doktorantka w tekście PRACY 3, być wynikiem albo degradacji wcześniej wytworzonego chlorofilu, albo zahamowania jego syntezy, albo obu tych zjawisk jednocześnie. Opisane w publikacji wyniki dotyczą między innymi stężenia w roślinie kwasu aminolewulinowego (ALA) oraz aktywności dehydratazy kwasu aminolewulinowego (ALAD), a zatem jednego z pierwszych etapów syntezy chlorofilu, co stanowi ciekawy aspekt badań Doktorantki, gdyż dane na temat wpływu antybiotyków na syntezę chlorofilu są bardzo ograniczone. Równie interesujące są wyniki dotyczące syntezy dużej podjednostki RUBISCO i jego aktywności, przy czym na uwagę zasługuje fakt, że w celu oznaczenia aktywności tego enzymu Doktorantka wykonała optymalizację (według mnie termin "walidacja" został tu użyty niepoprawnie) metody. Z ciekawością prześledziłam zatem zarówno omawianą publikację, jak i następną (Krupka i wsp. 2024, *The impact of soil and water pollutants released from poultry farming on the growth and development of two plant species.* Agriculture doi: 10.3390/agriculture14010087; **PRACA 4**), stanowiącą kontynuację badań doktorantki.

W pracy tej Pani mgr inż. Krupka postanowiła sprawdzić, czy wybrane przez nią wcześniej w warunkach typowo laboratoryjnych biomarkery fitotoksyczności tetracykliny sprawdzą się również podczas testowania gleb i wody pobranych z bezpośredniego sąsiedztwa ferm drobiu, a więc z miejsc

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
tel. +48 58 523 60 84
e-mail: anna.aksmann@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 59 B/209
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl

potencjalnie skażonych antybiotykami. Próbki gleb i wody przeanalizowano pod kątem obecności zanieczyszczeń organicznych, wykazując w nich obecność 7 antybiotyków, w tym tetracykliny oraz 3 rodzajów pestycydów. Co uważam za istotne, badania wykonane były na dwóch wcześniej testowanych gatunkach roślin, *Pisum sativum* i *Lemna minor*, co pozwala na porównanie uzyskanych wyników z wynikami przedstawionymi we wcześniejszych pracach. Porównując wyniki uzyskane dla tetracykliny z tymi uzyskanymi dla gleby/wody skażonej substancjami leczniczymi można zauważyć te same tendencje, choć oczywiście z innym nasileniem, a jednocześnie można zauważyć zróżnicowanie odpowiedzi badanych gatunków roślin na te same zanieczyszczenia (np. w przypadku produkcji białek HSP70). Z jednej strony wskazuje to na „uniwersalność" opisywanych parametrów biochemicznych jako wskaźników toksyczności, z drugiej pewną ich „specyficzność". „Uniwersalność" przejawia się w tym, że możemy zaobserwować tę samą tendencję dla substancji działającej pojedynczo i dla mieszaniny substancji oraz że wyznaczone biomarkery reagują w obydwu przypadkach zmianami. „Selektywność" niektórych biomarkerów widzę w ich zróżnicowanej odpowiedzi w zależności od testowanego gatunku. Oczywiście trzeba wziąć pod uwagę – jak słusznie zauważa Doktorantka w dyskusji omawianej pracy – że testowane próbki gleby/wody zawierają całą gamę substancji, które nie były oznaczane w analizach, a które mogą mieć wpływ na ogólną toksyczność tych prób. Być może dlatego niewielu badaczy decyduje się porównać wyniki uzyskane typowo w warunkach laboratoryjnych z rzeczywistymi próbami środowiskowymi – tym bardziej Pani mgr inż. Krupce należą się słowa uznania. W podsumowaniu tej pracy Doktorantka zwraca uwagę na potencjalne zagrożenia płynące z nawożenia upraw nawozami naturalnymi. Z drugiej strony, nawozy pochodzące z ferm drobiu czy gospodarstw nastawionych na hodowlę bydła są uważane za bezpieczne i „ekologiczne". Ciekawa jestem opinii Doktorantki w tej sprawie. Czy widzi ona w takim typie nawożenia więcej zagrożeń, czy jednak więcej korzyści.

Jest jeszcze jeden, bardzo ciekawy według mnie, aspekt poruszany zarówno w PRACY 3 jak i PRACY 4. Jak sama Doktorantka zauważa, na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie stwierdzić, dlaczego tetracyklina powoduje spadek ilości ALA i dużej podjednostki RUBISCO, czy też spadek aktywności ALAD i RUBISCO, a danych takich w literaturze w zasadzie nie ma. Mam zatem pytanie do Doktorantki, czy może wie, czy tego typu badania prowadzone są obecnie przez inne osoby z Zespole Pani prof. dr hab. Agnieszki Piotrowicz-Cieślak lub czy może zna prace na ten temat opublikowane przez inne zespoły badawcze. A może sama Doktorantka ma w dalszych planach takie badania?

Ponieważ badania Pani mgr inż. Krupki skupiają się działaniu antybiotyków, **PRACA 5** (Krupka M, Piotrowicz – Cieślak AI. 2024. *Optimization of the method for isolating bacterial DNA from the aboveground part of lettuce.* Int. J. Mol. Sci. 25: 8513. DOI: 10.3390/ijms25158513) oraz **MANUSKRYPT (6)** (*The impact of tetracycline on the soil microbiome and the rhizosphere of lettuce*

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
tel. +48 58 523 60 84
e-mail: anna.aksmann@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 59 B/209
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl

Gdańsk, 23.01.2025

(Lactuca sativa L.) skupiające się na mikrobiomie gleby i roślin traktowanych antybiotykami są konsekwentnym i wartościowym uzupełnieniem wcześniejszych badań.

MANUSKRYPT (6) jest ściśle związany z badaniami przedstawionymi w PRACY 5, choć Doktorantka zrezygnowała z badanych dotychczas roślin na rzecz sałaty (*Lactuca sativa* L.), co jest pewną niekonsekwencją w serii opublikowanych prac. Ciekawa jestem, co zdecydowało o wyborze materiału badawczego, prócz oczywistego argumentu wiążącego tę roślinę ze zdrowiem konsumujących ją ludzi?

Pomimo wspomnianej niekonsekwencji w wyborze organizmu, praca jest jak najbardziej spójna z poprzednimi badaniami, a wychodząc „poza roślinę" Doktorantka prezentuje szersze spojrzenie na problem zanieczyszczenia środowiska substancjami leczniczymi. W pracy wykazano, że tetracyklina w sposób istotny zmienia skład mikrobiomu gleby, promując jedne gatunki (w tym chorobotwórcze) na niekorzyść innych. Jest to bardzo niepokojące w kontekście wzrastającej lekooporności bakterii, stąd duże znaczenie tego typu badań. Zaskakującym (w pozytywnym sensie) wynikiem jest dla mnie wskazanie, że mikrobiom ryzosfery jest mniej podatny na działanie tetracykliny. Wskazanie przyczyn tego pozytywnego zjawiska byłoby bardzo interesujące i mam nadzieję, że Doktorantka nie porzuci tego wątku w dalszych badaniach, tym bardziej, że PRACA 5 wskazuje, iż Pani mgr inż. Krupka planuje w swojej pracy iść krok dalej. I słusznie, bo o ile coraz więcej danych potwierdza, że trafiające do środowiska antybiotyki modyfikować mogą mikrobiom glebowy, to od niedawna dopiero mówi się o znaczeniu mikrobiomu związanego z nadziemnymi częściami roślin, i to nie tylko w kontekście funkcjonowania samej rośliny, ale też jego znaczenia dla zdrowia odżywiających się tymi roślinami zwierząt oraz ludzi. Doktorantka, zauważając rozbieżności pomiędzy różnymi metodami izolacji DNA bakterii towarzyszących roślinom, postanowiła zoptymalizować metodę izolacji tegoż DNA, co jest procesem praco- i czasochłonnym oraz wymagającym szczególnej ostrożności, jak w każdym przypadku, kiedy mamy do czynienia z niejednorodnym materiałem biologicznym (tutaj: komórki roślinne i komórki bakterii). Mając tego świadomość, doceniam ilość przetestowanych wariantów doświadczalnych i szczegółowość analiz uzyskanych wyników. Co do tej pracy nasunęły mi się dwa pytania. Po pierwsze, optymalizacja prowadzona była na materiale pochodzącym z sałaty – czy Pani mgr inż. Krupka sprawdziła może w międzyczasie (albo czy zna takie badania) jak sprawdza się opracowany przez nią protokół w przypadku wcześniej badanych organizmów, tj. rzęsy drobnej i grochu? Druga rzecz, która mnie zainteresowała, dotyczy ściśle metodyki. W PRACY 5 Doktorantka wykazała, że metoda sprawdza się najlepiej dla dużej ilości materiału wyjściowego (tu było to 50 g), podczas gdy częstą bolączką badań jest właśnie niewielka ilość biomasy, którą można poddać analizie. Czy Doktorantka ma może wiedzę, jaka jest minimalna biomasa (oczywiście w przybliżeniu) pozwalająca uzyskać wiarygodne wyniki w tej metodzie ekstrakcji?

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
tel. +48 58 523 60 84
e-mail: anna.aksmann@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 59 B/209
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl

Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 23.01.2025

Podsumowując, za najważniejsze osiągnięcia Pani mgr inż. Magdaleny Krupki uważam:
- wykazanie, iż tetracyklina ma działanie fitotoksyczne, przejawiające się w niekorzystnych zmianach we wzroście, morfologii i procesach fizjologiczno-biochemicznych roślin i wskazanie potencjalnych markerów biochemicznych pozwalających monitorować te zmiany;
- wykazanie, iż procesy adaptacyjne uruchamiane w roślinach traktowanych tetracykliną umożliwiają im nie tylko przetrwanie w skażonym środowisku, ale też powrót do stanu względnej równowagi po ustaniu stresu;
- wykazanie, że nawozy naturalne pochodzące z ferm drobiu mogą, ze względu na zawartość w nich m.in. antybiotyków i pestycydów, wpływać niekorzystnie na funkcjonowanie roślin;
- wykazanie, że tetracyklina zmienia mikrobiom gleby, w tym mikrobiom związany z ryzosferą.

Wniosek końcowy

Rozprawa Pani mgr inż. Magdaleny Krupki: „Reakcja ekofizjologiczna roślin na zanieczyszczenie antybiotykami" przygotowana pod opieką promotorską Pani prof. dr hab. Agnieszki Piotrowicz-Cieślak, spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2024.1571 ze zm.), tj.:
- stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim jest przybliżenie zmian zachodzących w roślinach i ich otoczeniu w odpowiedzi na obecność antybiotyków, ze szczególnym uwzględnieniem tetracykliny,
- prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki biologiczne i specjalistyczną w zakresie ekofizjologii;
- świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej na wszystkich jej etapach, od formułowania hipotez i planowania badań, po interpretację wyników i wyciąganie wniosków.

Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Krupki i dopuszczenie jej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Katedra Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
tel. +48 58 523 60 84
e-mail: anna.aksmann@ug.edu.pl
ul. Wita Stwosza 59 B/209
80-308 Gdańsk
www.ug.edu.pl