

Dr hab. Monika Załęska-Radziwiłł
Prof. nzw. PW
Politechnika Warszawska
Wydział Instalacji Budowlanych
Hydrotechniki i Inżynierii Środowiska

Warszawa 30.05. 2017 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej **mgr inż. Michała Baciaka**

pt: **„Reakcje wybranych roślin na zanieczyszczenie środowiska antybiotykami
stosowanymi w medycynie weterynaryjnej”**

Promotorzy:
prof. dr hab. Barbara Adomas
dr hab. Agnieszka I. Piotrowicz-Cieślak, prof. UWM

Podstawa formalna

Recenzję pracy doktorskiej mgr inż. Michała Baciaka opracowano zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, na podstawie pisma Pana Dziekana prof. dr hab. Krzysztofa Młynarczyka z dnia 10. 05. 2017 r. (WKŚiR.DZ.6350.6.2015).

Celowość podjęcia tematu

Wzrost produkcji i użycia leków wpływa na zwiększenie stężenia farmaceutyków i produktów ich metabolizmu w ściekach surowych, biologicznie oczyszczonych, w glebie, w wodach powierzchniowych, a także w wodzie przeznaczonej do picia. Zużycie poszczególnych grup farmaceutyków w ciągu roku waha się w poszczególnych krajach od kilkudziesięciu do kilkuset ton. Szacuje się, że połowa antybiotyków aplikowanych w ciągu roku na świecie dotyczy hodowli zwierząt. Leki używane w weterynarii są często wprowadzane bezpośrednio do wód. Substancje farmaceutyczne obecne w glebach nawożonych odchodami zwierząt lub wskutek wykorzystania osadów ściekowych są pobierane przez rośliny oraz wymywane trafiają do wód powierzchniowych. Antybiotyki zawarte w ściekach, glebie i wodach stwarzają warunki do wzrostu lekooporności drobnoustrojów, zakłócają procesy oczyszczania ścieków i równowagę ekologiczną

w ekosystemach.

W komórkach roślin powstały unikatowe mechanizmy molekularne, które bardzo często pozwalają im przetrwać lub zminimalizować czynniki stresowe. Oprócz wielu przystosowań morfologicznych, istotną rolę odgrywają mechanizmy fizjologiczne, metaboliczne i genetyczne. Są one często uruchamiane w obecności ksenobiotyków obecnych w środowisku, (np. antybiotyków) a zarejestrowanie zmiany stanowiące „biologiczną odpowiedź” na stres mogą pełnić rolę biomarkerów o wysokiej specyficzności. Z uwagi na fakt, że formuły aktywne leków wykrywane są w elementach środowiska w małych stężeniach lub występują w stężeniach poniżej poziomu wykrywalności, istnieje potrzeba rozwoju czułych metodyk testowych do monitorowania ich ekotoksyczności. Biorąc powyższe pod uwagę, wybór tematyki rozprawy doktorskiej uważam za w pełni uzasadniony.

Analiza treści pracy i ocena merytoryczna

Przedstawiona rozprawa doktorska zgodnie ze znowelizowanymi przepisami Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), została złożona w formie jednotematycznego cyklu publikacji pod wspólnym tytułem: „*Reakcje wybranych roślin na zanieczyszczenie środowiska antybiotykami stosowanymi w medycynie weterynaryjnej*” opublikowanych w latach 2014-2017:

1. Sikorski Ł., Adomas B., Dobiesz M., **Baciak M.**, Piotrowicz-Cieślak A.I. 2014. Morphological and biochemical responses of *Lemna minor* L. (common duckweed) to ciprofloxacin. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23(2): 363-371. **IF₂₀₁₆ – 0.31; MNiSW₂₀₁₆ – 15 pkt.**
2. **Baciak M.**, Sikorski Ł., Piotrowicz-Cieślak A.I., Adomas B. 2016. Content of biogenic amines in *Lemna minor* (common duckweed) growing in medium contaminated with tetracycline. *Aquatic Toxicology*, 180: 95-102. **IF₂₀₁₆ – 4.35; MNiSW₂₀₁₆ – 45 pkt.**
3. **Baciak M.**, Piotrowicz-Cieślak A.I., Adomas B. 2016. Uptake of chlortetracycline by yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) growing under photoperiod or at constant darkness. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(12): 5096-5104. **IF₂₀₁₆ – 0.31; MNiSW₂₀₁₅ – 15 pkt.**

4. **Baciak M.**, Piotrowicz-Cieślak A.I., Adomas B. 2015. Kształtowanie się cech morfologicznych i biochemicznych łubinu żółtego rosnącego na glebie zanieczyszczonej chlorotetracykliną w warunkach fotoperiodu i ciemności. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 583: 3-11. **MNiSW₂₀₁₅ – 13 pkt.**
5. **Baciak M.**, Sikorski Ł., Piotrowicz-Cieślak A.I., Adomas B. 2017. Role of decarboxylases in the biochemical pathway of biogenic amines of pea (*Pisum sativum* L.) growing in soil contaminated with lomefloxacin. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15(3): 1131-1148. **IF₂₀₁₆ – 0.78; MNiSW₂₀₁₅ – 15 pkt.**

Sumaryczny IF – 5.75

Sumaryczna punktacja MNiSW – 103 pkt.

Załączone publikacje zostały poprzedzone przewodnikiem zawierającym kolejno: streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz 7 rozdziałów - Wstęp (4), Hipoteza badawcza i cel badań (5), Materiały i metody (6), Omówienie publikacji stanowiących rozprawę doktorską (7), Wnioski (8), Literatura (9), Załączniki (10).

Pan mgr inż. Michał Baciak jest pierwszym autorem czterech wymienionych w rozprawie artykułów, a jego udział merytoryczny we wszystkich publikacjach potwierdzony załączonymi oświadczeniami wynosił od 55% do 70%. Dane te wskazują na wiodącą rolę Doktoranta w ich opublikowaniu. Wkład ten polegał na wykonywaniu badań eksperymentalnych, analizie i opracowaniu wyników oraz dyskusji, a także przygotowaniu tekstu publikacji.

Celem dysertacji była ocena wpływu antybiotyków z grupy tetracyklin (**tetracyklina**, **chlorotetracyklina**) i fluorochinolonów (**cyprofloksacyna**, **lomefloksacyna**) na morfologię oraz cechy biochemiczne i fizjologiczne wybranych roślin wyższych – wodnych i lądowych.

Do realizacji zamierzonego celu zaproponowano zakres badań obejmujący:

- ✓ określenie fitotoksyczności cyprofloksacyny i tetracykliny w odniesieniu do rzęsy drobnej - *Lemna minor*;
- ✓ ocenę fitotoksycznego oddziaływania chlorotetracykliny obecnej w glebie na siewki łubinu żółtego - *Lupinus luteus*;
- ✓ określenie fitotoksyczności lomefloksacyny w odniesieniu do siewek grochu - *Pisum sativum*.

Mierzone punkty końcowe reakcji testowych w badaniach z zastosowaniem rzęsy drobnej

obejmowały: długość korzenia i łodygi, świeżą i suchą masę, zawartość chlorofilu i karotenoidów a także w przypadku cyprofloksacyny - węglowodanów rozpuszczalnych a w badaniach z tetracykliną - amin biogennych.

W siewkach łubinu narażonych na działanie chlorotetracykliny obecnej w glebie w warunkach fotoperiodu i ciemności poddano ocenie długość korzeni i łodyg, świeżą i suchą masę, aktywność peroksydazy, dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, potencjał osmotyczny oraz zawartość chlorotetracykliny w korzeniach i łodygach.

Fitotoksyczność lomefloksacyny w odniesieniu do siewek grochu określono na podstawie analizy długości korzeni i łodyg grochu, ich świeżej i suchej masy, potencjału osmotycznego, zawartości amin biogennych (tyraminy, putrescyny, kadaweryny, spermidyny, agmatyny i sperminy) oraz aktywności dekarboksylaz (dekarboksylazy ornityny, dekarboksylazy argininy i dekarboksylazy S-adenozylometioniny). Zakres badań wskazuje na interdyscyplinarny charakter recenzowanej pracy doktorskiej.

Część teoretyczna rozprawy zawarta w przewodniku oraz w publikacjach uwzględniająca dane z najnowszych pozycji piśmiennictwa stanowi dobre wprowadzenie do badań własnych Doktoranta. Warsztat badawczy przedstawiony w metodyce badań reprezentuje wysoki poziom merytoryczny.

Wyniki badań zaprezentowane w cyklu prac potwierdziły, że antybiotyki z grupy tetracyklin i fluorochinolonów zanieczyszczające wody powierzchniowe i glebę mogą indukować zmiany biochemiczne i morfologiczne w komórkach roślin wyższych – wodnych i lądowych.

Cyprofloksacyna rozpuszczalna w wodzie, w stężeniu 1,25 mM hamowała wzrost rzęsy drobnej w 100%, a $EC_{50-7dni}$ wg Autora wynosiło 0,0097 mM i 0,0143 mM odpowiednio dla formy rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej. Te wyniki wskazują, że wg klasyfikacji Unii Europejskiej w odniesieniu do toksyczności ostrej cyprofloksacyna jest toksyczna dla *Lemna minor*. W pracy wykazano również, że narażenie na cyprofloksacynę w niskich stężeniach generowało wzrost stężeń niektórych węglowodanów rozpuszczalnych w porównaniu z próbką kontrolną.

Badania z zastosowaniem rzęsy drobnej poddanej działaniu tetracykliny pozwoliły Autorowi na wyznaczenie stężeń efektywnych (EC_x) w odniesieniu kilku punktów końcowych reakcji testowej. Wartości $EC_{50-7dni}$ zawierały się w zakresie od 0,15 μ M (zawartość sperminy) do 28,12 μ M (zawartość putrescyny). Inhibicja wzrostu rośliny w najwyższym badanym stężeniu tetracykliny (80 μ M) nie przekraczała 80%.

Analizę fitotoksyczności chlorotetracykliny obecnej w glebie wobec łubinu żółtego

przeprowadzono w dwóch seriach badań, w różnych zakresach stężeń antybiotyku. W stężeniach od $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ - $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Publikacja 3) wykazano, że zawartość antybiotyku była większa w korzeniach i łodygach roślin rosnących w ciemności niż w fotoperiodzie. W tych warunkach stwierdzono również wyższą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej. W zakresie stężeń od $1,45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ - $46,38 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ aktywność peroksydazy w korzeniach łubinu żółtego była wyższa niż w łodygach i zmalała wraz ze wzrostem zawartości antybiotyku w glebie. W warunkach fotoperiodu zaobserwowano spadek aktywności tego enzymu w tkankach łodyg w porównaniu z kontrolą. W tych samych warunkach stwierdzono również stopniowy wzrost aktywności katalazy w korzeniach i istotny wzrost w łodygach. Dodatkowo, wraz ze wzrostem stężeń antybiotyku w glebie, wykazano wzrost ciśnienia osmotycznego w komórkach roślin (większy w ciemności).

Badania fitotoksyczności lomefloksacyny w zakresie stężeń od $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ - $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby pozwoliły Autorowi na wyznaczenie stężeń efektywnych (EC_x) w odniesieniu do wzrostu siewek grochu, zawartości 6 amin biogennych i aktywności 3 dekarboksylaz. Z analizy wartości $EC_{50-9\text{dni}}$ wynika, że w przypadku korzeni najbardziej czułymi punktami końcowymi reakcji testowych były aktywność dekarboksylazy ornityny i zawartość putrescyny ($EC_{50-9\text{dni}}$ równe odpowiednio $1,58 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i $1,84 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a w przypadku łodyg oprócz aktywności ww. enzymu, zawartość tyraminy ($EC_{50-9\text{dni}} = 5,53 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i $4,90 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Przedstawione w dysertacji wyniki badań własnych zostały przez Doktoranta odniesione do danych literaturowych i wnikliwie przedyskutowane.

Do najważniejszych, oryginalnych osiągnięć rozprawy doktorskiej należy zaliczyć:

- ✓ Wykazanie, na przykładzie cyproloksacyny, że antybiotyki obecne w wodach powierzchniowych mogą powodować wzrost stężeń niektórych węglowodanów rozpuszczalnych w komórkach *Lemna minor*;
- ✓ Zidentyfikowanie 5 amin biogennych w komórkach *Lemna minor* i udowodnienie wzrostu stężeń 4 z nich wraz ze zwiększającą się zawartością tetracykliny w podłożu;
- ✓ Wykazanie, że wysoki wzrost stężeń niektórych amin w komórkach rzęsy drobnej pod wpływem tetracykliny może stanowić dodatkowe zagrożenie dla organizmów ekosystemu wodnego;
- ✓ Potwierdzenie, na podstawie oznaczenia zawartości chlorotetracykliny oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych, w korzeniach i łodygach *Lupinus luteus* rosnących w warunkach fotoperiodu i ciemności, że tetracykliny są związkami wrażliwymi na światło i łatwo ulegają fotolizie;

- ✓ Udowodnienie, na przykładzie siewek *Pisum sativum*, że ze względu na istotne wahania zawartości poszczególnych amin biogennych w cyklu rozwojowym rośliny, lepszym biomarkerem gleby zanieczyszczonej lomefloksacyną jest aktywność dekarboksylazy ornityny.

Na podkreślenie zasługuje również zarekomendowanie metody analitycznej opartej o pomiar ilości wydzielonego CO₂ do oceny aktywności enzymów ze szlaku biosyntezy amin biogennych.

Uwagi dyskusyjne i szczegółowe

Zagłębiając się w szczegóły pracy doszukano się kilku elementów, które mogą być przedmiotem dyskusji:

1. Cel pracy, w mojej ocenie, powinien być sformułowany w odniesieniu całej dysertacji. W rozdziale 5 przewodnika – Hipoteza badawcza i cel badań - sformułowano odrębne cele i zakres badań dla każdej publikacji. Brak jest również jasno sformułowanej tezy/tezy.
2. W streszczeniu w przewodniku Autor napisał: „*Wyznaczono wskaźniki toksyczności (EC, NOEC), dzięki którym wykazano zakresy stężeń bezpiecznych i toksycznych wybranych leków wobec amin biogennych, aktywności enzymów i tempa wzrostu oraz plonowania.*” W pracy nie zauważyłam wartości NOEC, brak jest również wyjaśnienia skrótu. Jakie kryteria zastosował Autor do określenia stężeń bezpiecznych i co rozumie pod pojęciem stężeń bezpiecznych badanych leków?
3. Co skłoniło Autora do przeprowadzenia badań ekotoksyczności cyprofloksacyny w odniesieniu do rzęsy drobnej w zakresie bardzo wysokich stężeń substancji aktywnych?
4. Czy właściwym według Autora wydaje się analizowanie zawartości węglowodanów rozpuszczalnych w stężeniach 5 mM - 40 mM cyprofloksacyny rozpuszczalnej, skoro stwierdził, że stężenie 1,25 mM było śmiertelnym dla rzęsy drobnej? - str. 25 i 26 rozdział 7 przewodnika i str. 371 w publikacji 1, rozdział 5. Co Autor rozumie pod pojęciem stężenie śmiertelne? Jakie wartości inhibicji wzrostu informują o efekcie letalnym?
5. Wyjaśnienia wymaga sposób, w jaki został wyliczony % efektu toksycznego niezbędny do wyliczenia EC_x (publikacje 2 i 5). Proszę o zdefiniowanie EC₅₀ w odniesieniu do badanych punktów końcowych reakcji testowych w badaniach

ekotoksyczności tetracykliny (publikacja 2) i lomefloksacyny (publikacja 5) i wyjaśnienie jak obliczono EC_x . Zdanie w rozdziale *Statistical analysis* str 1135 w publikacji 5 jest niezrozumiałe, a na str. 97 publikacji 2 jest co prawda logiczne, ale nie merytoryczne, ponieważ nie przedstawia metody obliczeniowej EC_x .

6. Co skłoniło Autora do wyboru typu większości wykresów nie odzwierciedlających różnicy stężeń na osi X. Dlaczego nie wybrano wykresu liniowego? Jaką metodą wyznaczono EC_{50} przedstawione w publikacji 1, na rysunku 1.

W pracy, szczególnie w przewodniku, zauważono szereg skrótów myślowych, pewne drobne błędy i usterki redakcyjne jak np.:

- ✓ **Str. 10** – Przewodnik: W streszczeniu w języku angielskim w ostatnim akapicie napisan: „*In the tested plants (publications 1–5), biogenic amines were identified and assayed; moreover, the activity of dehydrogenases involved in the biosynthesis of biogenic amines, inter alia S-adenosylmethionine decarboxylase, arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase, was also assessed*” **zamiast dehydrogenases powinno być decarboxylases.**
- ✓ **Str. 14** – Przewodnik: „*Tetracykliny są wrażliwe na światło, przez co proces fotodegradacji, który odbywa się w warstwach wody blisko jej powierzchni może uszkadzać rośliny pływające (na przykład rzęś).*” - Skrót myślowy.
- ✓ **Str. 25 publikacja 1 i wniosek 1 str. 32** „*Wzrost zawartości myo-inozytolu i D-chiro-inozytolu zaobserwowano już przy niewielkich stężeniach CIP rozpuszczalnej.*” Z wykresu nr 2, publikacja 1 to nie wynika. Względem czego obserwowano wzrost zawartości tych węglowodanów?
- ✓ **Publikacja 4 str. 9 – Wnioski, punkt 3** „*Aktywność enzymów zwiększała się w tkankach korzeni i łodyg wyrosłych w glebie skażonej 46,38 mg chlorotetracykliny na 1 kg gleby.*” Analizując wykresy (4 i 5 str. 8) nasuwa się pytanie: względem czego zwiększała się aktywność i czy w przypadku obydwu badanych enzymów?
- ✓ **Str. 30** – Przewodnik: „*Badania wykazały, że już najniższe z zastosowanych stężeń LOM hamuje aktywność ODC, a wyższe powodują wzrost aktywności ADC i SAMDC*” – Uważam, że ta analiza wyników zaprezentowanych na wykresie 7, (str. 1139 publikacja 5) jest dalece nieprecyzyjna.
- ✓ **Str. 33** – Przewodnik, Wniosek 8. Najbardziej **wrażliwą aminą biogenną** na lomefloksacynę była putrescyna, zaś najbardziej **odporną spermina**. – skrót myślowy, czy w tym kontekście możemy mówić o wrażliwości amin?

- ✓ W przewodniku poprzedzającym publikację nagminnie stosowane są skróty, co w pewnym stopniu utrudnia lekturę opracowania (pomimo załączonego wykazu) Np. **str. 27:**

*„Jednym z najważniejszych wyników tej pracy było opisane reakcji **BA** na **TC**. Z wyjątkiem **CAD**, zawartość pozostałych **BA** wzrastała wraz ze wzrostem stężeń **TC** w pożywce. Mimo, że najwyższe stężenie leku (78 μM) spowodowało czternastokrotny wzrost zawartości **TYR**, to liczbowo najbardziej wzrosła zawartość **SPD** (o 314.19 $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ suchej masy).”*

oraz str. 30: *„Badania wykazały, że już najniższe z zastosowanych stężeń **LOM** hamuje aktywność **ODC**, a wyższe powodują wzrost aktywności **ADC** i **SAMDC**. Zawartość **PUT** jest skorelowana z aktywnością **ADC**. Sugerujemy, że poziom tej aminy jest związany z biosyntezą **AGM**, katalizowaną przez **ADC**”*

Powyższe uwagi nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy, którą oceniam w pełni pozytywnie. Realizacja pracy umożliwiła przeprowadzenie kompleksowej oceny ekotoksykologicznej czterech antybiotyków z grupy tetracyklin i fluorochinolonów, powszechnie stosowanych w terapii ludzi i zwierząt w odniesieniu do wybranych roślin wyższych - wodnych i lądowych. Dogłębna analiza zmian morfologicznych, biochemicznych i fizjologicznych z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi badawczych pozwoliła na udowodnienie, że aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych oraz ze szlaku biosyntezy amin biogennych mogą być dobrymi biomarkerami wody i gleby zanieczyszczonej antybiotykami. Szeroki zakres testów użytych w ocenie potencjału toksycznego wybranych antybiotyków oraz nowatorskie podejście do zastosowanych technik analitycznych wpływają na dużą wartość poznawczą i metodyczną pracy. Doktorant wykazał się umiejętnością rozwiązywania trudnych problemów badawczych z dziedziny fizjologii, chemii, biochemii i ekotoksykologii. Uważam, że praca stanowi wartościowe osiągnięcie naukowe a jej treść kwalifikuje Pana mgr inż. Michała Baciaka do ubiegania się o stopień doktora nauk rolniczych w zakresie dyscypliny naukowej *ochrona i kształtowanie środowiska*.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że praca pt: **„Reakcje wybranych roślin na zanieczyszczenie środowiska antybiotykami stosowanymi w medycynie weterynaryjnej”** spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w zgodzie z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki

- Dz.U. Nr 65 poz.595 wraz z późniejszymi zmianami i stawiam wniosek o dopuszczenie Pana **mgr Michała Baciaka** do jej publicznej obrony przed Radą Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego.

M. Raczini