

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr Grzegorza Siedlewicza

pt. „Pozostałości antybiotyków w osadach dennych południowego Bałtyku-stężenia i wpływ na bakteriocenozę”

Podstawa opracowania

Recenzję opracowano na wniosek Rady Naukowej Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie i pisma NK/403/14 z dnia 26.02.2014 podpisanego przez z-cę Dyrektora ds. Naukowych dr hab. Ksenię Pazdro prof. nadzw. IO PAN.

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska wykonana w Zakładzie Chemii i Biochemii Morza Instytutu Oceanologii PAN w Sopocie. Promotorem rozprawy jest dr hab. Ksenia Pazdro prof. nadzw. IO PAN.

Rozprawa składa się z pięciu podstawowych rozdziałów, podsumowania i wniosków w j. polskim i w j. angielskim oraz spisu literatury. Praca łącznie obejmuje 178 stron, w tym 12 strony zawierające wykaz cytowanej literatury, 27 rysunków i 23 tabele. Spis literatury składa się z 235 pozycji, głównie anglojęzycznych.

W rozdziale pierwszym (Wstęp i cel badań oraz zakres prac) Doktorant krótko naświetlił problematykę występowania pozostałości antybiotyków w środowisku przyrodniczym jako skutków aktywności człowieka oraz przedstawił cel i zakres prac badawczych. W rozdziale drugim (Część teoretyczna) omówił charakterystykę badanych związków, ich źródła i los środowiskowy oraz charakterystykę południowego Bałtyku i bakteriocenozy osadów dennych, a także metodykę oznaczania pozostałości antybiotyków w próbkach środowiskowych.

Zasadnicza część badań została przedstawiona w rozdziałach od 3 do 6 (Część doświadczalna, Wyniki, Dyskusja oraz Podsumowanie i wnioski).

Rozprawa jest napisana jasno, poprawnym językiem, starannie zredagowana oraz umiejętnie zilustrowana rysunkami i zestawieniami tabelarycznymi prezentującymi wyniki badań.

Problematyka i ocena rozprawy

Problematyka powszechnego występowania pozostałości antybiotyków w licznych elementach środowiska przyrodniczego jest bardzo aktualna. Doktorant w rozprawie skoncentrował się na słabo rozpoznanym pod tym względem obszarze - osadach dennych południowego Bałtyku.

Zasadniczym celem rozprawy jest cyt.:

„Weryfikacja hipotezy o narażeniu osadów południowego Bałtyku i bytujących w nich mikroorganizmów na obecność zanieczyszczeń z grupy antybiotyków”.

Doktorant do prac badawczych wytypował antybiotyki należące do sulfonamidów, chinolonów, tetracyklin oraz trimetoprim.

Sformułował szczegółowe cele rozprawy w których skoncentrował się na:

- *optymalizacji procedur izolacji i badaniu występowania wybranych antybiotyków,*
- *badaniu wpływu czynników środowiskowych i cech fizykochemicznych wybranych antybiotyków na zawartość ich pozostałości w osadach,*
- *na określeniu wpływu oznaczonych pozostałości antybiotyków na bakterie osadów dennych.*

W celu zrealizowania założonego celu badań przeprowadził szeroki zakres prac badawczych.

Materiał do badań stanowiły próbki powierzchniowych warstw osadów dennych i wody przydennej z rejonu południowego Bałtyku pobierane w latach 2010-2013 podczas rejsów badawczych statku r/v Oceania i w 2011 r. w trakcie rejsu jachtem TASK. Lokalizacja punktów pomiarowych została szczegółowo przedstawiona na Rys. 6 i w Tabl. 9. Sposób pobierania próbek nie budzi wątpliwości.

Doktorant wykonał oznaczenia wybranych fizykochemicznych parametrów próbek wód (temperatura, pH, zasolenie, stężenie węgla rozpuszczonego), osadów (wilgotność, uziarnienie, zawartości materii organicznej i węgla organicznego) i wód porowych (stężenie węgla organicznego) oraz określił zdolność sorpcyjną próbek osadów w stosunku do wytypowanych antybiotyków (równowagowe współczynniki sorpcji i izotermi sorpcji, pseudo-współczynnik podziału osad/woda).

Obszerną część rozprawy, poświęcił metodyce oznaczania pozostałości antybiotyków z grupy tetracyklin, sulfonamidów, chinolonów oraz trimetoprimu w osadach morskich, walidacji zastosowanych procedur analitycznych oraz badaniu sorpcji antybiotyków do osadów. W tej części rozprawy szczegółowo przedstawił procedurę oznaczania pozostałości antybiotyków w osadach morskich w tym: izolację i wzbogacanie tetracyklin, izolację i wzbogacanie sulfonamidów, chinolonów oraz trimetoprimu oraz izolację i wzbogacanie sulfonamidów, chinolonów oraz trimetoprimu z próbek wody przydennej, a ponadto oznaczenie pozostałości antybiotyków z zastosowaniem techniki LC-MS/MS i walidację zastosowanych procedur analitycznych.

Ocena merytoryczna metodyki oznaczania antybiotyków nie wchodzi zakres prezentowanej recenzji.

Następnie przeprowadził laboratoryjne badania mikrobiologiczne nad wpływem oznaczonych pozostałości antybiotyków na wzrost bakterii wyizolowanych z osadów dennych. Z trzech próbek osadu dennego wyizolował po dwa szczepy bakteryjne (łącznie 6 szczepów), które poddał identyfikacji na podstawie sekwencji genu 16S rDNA. Zbadał wpływ pozostałości antybiotyków na ogólną liczbę bakterii oraz na liczbę bakterii żywych (z aktywną błoną biologiczną) zawartych w wytypowanych próbkach osadów.

Zasadnicza część wyników rozprawy (rozdz. 4.3) koncentruje się nad badaniem stężeń pozostałości antybiotyków w: powierzchniowych próbkach osadów dennych (0-5 cm) (łącznie 62 próbki), rdzeniu z rejonu Głębi Gdańskiej (jeden rdzeń) i w próbkach wody przydennej (21 próbek). Przedstawiono w niej stężenia 14 badanych pozostałości antybiotyków należących do grupy sulfonamidów (sulfatiazol, sulfapirydyna, sulfamerazyne, sulfametazyne, sulfametiazol, sulfachloropirydazyne, sulfametoksazol, sulfisoksazol, sulfadimetoksyna), 2 z grupy chinolonów (kwasu oksolinowy, enrofloksacyne), 2 z grupy tetracyklin (tetracyklina i oksytetracyklina) oraz trimetoprimu.

Tego typu oznaczenia zostały przeprowadzone po raz pierwszy dla osadów dennych południowego Bałtyku.

Doktorant wykazał, iż 89% próbek osadów dennych południowego Bałtyku zawierało (ze zróżnicowaną częstotliwością) przynajmniej jedną z czternastu badanych substancji, przy czym najwyższe ich stężenia najczęściej notowano w osadach mulistych bogatych w substancje organiczne.

Wśród sulfonamidów do najczęściej wykrywanych należały dwa: sulfametoksazol i sulfachloropirydazyna, które występowały odpowiednio w 58% i 32% analizowanych próbek osadów dennych.

Drugą, najczęściej wykrywaną substancją był trimetoprim, którego obecność stwierdził w 45% badanych próbek, a jego najwyższe stężenia zanotował w próbce osadu mulistego z dna o charakterze transportowym.

Tetracyklinę oznaczył w 17 % próbek osadów dennych (tylko w r. 1012), a oksytetracyklinę w 48% badanych próbek w stężeniach, przy czym najwyższe stężenia występowały w osadzie mulistym o charakterze akumulacyjnym.

Z kolei pozostałości antybiotyków należących do grupy chinolonów wykrył tylko w 3% próbek osadów dennych.

Charakterystyczne przestrzenne i czasowe zróżnicowanie stężeń badanych związków Autor tłumaczy zmiennym ładunkiem zanieczyszczeń docierających do wód przybrzeżnych oraz stopniem ich rozprzestrzenienia, a który jest wypadkową procesów sorpcji, transportu i rozkładu, a także składu granulometrycznego osadów dennych.

W dobrze zaplanowanym programie prac badawczych Doktorant poszukuje głównych źródeł pozostałości antybiotyków w osadach dennych.

Na podstawie rozkładu pozostałości antybiotyków w osadach dennych Zatoki Gdańskiej i Zatoki Puckiej wnioskuje, iż w pierwszym przypadku głównymi źródłami są: wody Wisły i odpływy z oczyszczalni „Wschód” w Gdańsku, a w drugim odpływ z oczyszczalni „Dębogórze” w Gdyni, które wprowadzają je w sposób ciągły.

Ponadto, na podstawie wyników badań osadów dennych w punktach kontrolnych położonych w rejonach ujść rzek wzdłuż wybrzeża Polski: Łeby, Słupi, Wieprzy i Parsęty w których wykazał obecność badanych pozostałości antybiotyków potwierdził hipotezę, iż w/w rzeki są ich znaczącym źródłem.

Ważnym wnioskiem, wynikającym z przeprowadzonych badań jest stwierdzenie o nie występowaniu kumulacji pozostałości antybiotyków w osadach dennych w rejonie Głębi Gdańskiej, w odróżnieniu od wykazanej w licznych pracach kumulacji większości antropogenicznych, głównie hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych i metali ciężkich.

Doktorant badając czynniki decydujące o rozprzestrzenianiu pozostałości antybiotyków w środowisku Południowego Bałtyku dużą uwagę poświęcił procesom sorpcji oraz warunkom środowiskowym.

Zbadał wartość pseudo-współczynnika podziału osad/woda i wykazał potencjalną sorpcję pozostałości sulfonamidów i tetracyklin do osadów bałtyckich. Na podstawie wyznaczonych wartości współczynników korelacji liniowych Pearsona określił:

- statystycznie istotne silne zależności pomiędzy stężeniami sulfachloropirydazyny, oksytetracykliny i trimetoprimu a zawartością węgla organicznego, materii organicznej oraz zawartości frakcji osadu <0,063 mm,

- ujemną korelację stężeń trimetoprimu, sulfachloropirydazyny i oksytetracykliny z natlenieniem wody przydennej,

- ujemną zależność stężeń tetracykliny i oksytetracykliny od zasolenia.

Następnie dokonał oceny ryzyka ekotoksykologicznego zidentyfikowanych pozostałości antybiotyków (Rozdz.5.3). Na podstawie wartości ilorazu MEC/PNEC_{wody} stwierdził, iż w określonych lokalizacjach stężenia sulfametoksazolu mogą stwarzać wysokie zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania ekosystemu wód Bałtyku, kwas oksolinowy

średnie, a trimetprim i sulfametazyna niskie, przy czym zastrzega, iż są to wyniki wymagające potwierdzenia w dalszych pracach badawczych.

W Rozdziale 5.4 Autor zinterpretował wyniki swoich badań laboratoryjnych nad wpływem pozostałości badanych antybiotyków na bakteriocenozę południowego Bałtyku. Stwierdził, iż jedynie tetracyklina hamowała wzrost większości badanych szczepów bakteryjnych wyizolowanych z osadów bałtyckich, a silniejsze działanie niż pojedyncze antybiotyki miały ich mieszaniny.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki można uznać za wstępne, gdyż zastosowana metodyka badań (Rozdz.3.13. 1.4) jest dyskusyjna.

Badania w tym zakresie przeprowadził na 7 szczepach bakterii: *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. guineae*, *Ps. baetica*, *Bacillus barbaricus*, *B. niacini*, *Microbacterium oxydans* i *Shewanella denitrificans* wyizolowanych z osadów dennych.

Należy zwrócić uwagę, iż procedura badania oddziaływania antybiotyków na bakterie była prowadzona w całkowicie odmiennych warunkach, niż w środowisku osadów dennych (brak osadów, wyższa temperatura, wyższe natlenienie, krótki czas kontaktu).

Nasuują się następujące pytania:

- czy określono temperatury kardynalne badanych szczepów,
- dlaczego badania nad wpływem dwóch stężeń antybiotyków (0,5 mg/ml i 0,5 µg/ml) na wzrost szczepów bakteryjnych na płynnej pożywce prowadzono w temperaturze 30°C przez 6h (w rozprawie nie podano źródła zastosowanej metody badań),
- jak proces sorpcji antybiotyków w osadach dennych wpływał na ich toksyczność w stosunku do bakterii.

W dalszej części Rozdziału 5.4 Doktorant zinterpretował wyniki badań dotyczących ogólnej liczby bakterii (OLB) i liczby żywych komórek bakterii (z aktywną błoną komórkową) w świeżo pobranych próbkach osadu dennego i po 3 tygodniowej inkubacji w temperaturze 4°C oraz analogiczne badania próbek osadu do których wprowadził wytypowane antybiotyki oraz ich mieszaniny.

Na podstawie uzyskanych wyników Autor wprawdzie ocenił, iż bakterie występujące w próbkach osadów powoli przystosowywały się do mieszaniny antybiotyków, to zaznacza, iż uzyskane wyniki są obarczone pewnym błędem związanym z niską precyzją mikroskopii epifluorescencyjnej z zastosowaniem barwnika fluorescencyjnego DAPI przy oznaczaniu liczby bakterii w osadach mulistych Bałtyku.

Próbkę osadu wykorzystaną w omawianych badaniach pobrano na głębokości 75 m, z powierzchniowej warstwy osadu dennego (temp. 4,8-6,9 °C, 5,5-6,9 mg O₂/dm³). Wydobyte próbki na powierzchnię i trzytygodniowa inkubacja (bez dodatku antybiotyków), z trzykrotnym dziennym mieszaniem oraz co tygodniowym pobieraniem wymieszanej subpróbki spowodowały zmianę warunków redoksowych i wpłynęły na warunki wzrostu obecnych w niej bakterii. Tym można tłumaczyć zaobserwowany początkowo (po 1 tygodniu inkubacji osadu kontrolnego bez dodatku antybiotyków) znaczący spadek liczby żywych komórek bakterii. Natomiast stopniowy wzrost ich liczby, która po trzy tygodniowej inkubacji osiągnęła wartość przekraczającą wyjściową, wskazuje, iż po zaadaptowaniu się do nowych warunków ich rozwój był intensywniejszy (udział procentowy żywych komórek był wyższy, niż w próbce świeżo pobranej).

Wprowadzenie wybranych antybiotyków oraz ich mieszanin spowodowało kolejną zmianę warunków wzrostu bakterii obecnych w osadach, która objawiła się obniżeniem ich liczby w stosunku do kontroli, przy czym w największym stopniu liczba bakterii zmalała w osadzie z dodatkiem mieszaniny sulfametaksazol/trimetoprim. Należy dodać, iż na wynik badania pewien wpływ mogło mieć także wyjściowe zanieczyszczenie próbki osadu dennego dwoma antybiotykami: sulfametoksazolem w stężeniu 1,75 ng/g s.m oraz trimetoprimem w stężeniu 9,1 ng/g s.m.

Pomimo niskiej precyzji pomiarów zastosowanej metody oznaczania ogólnej liczby bakterii i liczby żywych komórek bakterii Doktorant słusznie ocenił, iż badane związki mogą negatywnie wpływać na bakterie występujące w osadach dennych.

Uwagi szczegółowe o charakterze edytorskim

- ss. 20, 21, 130, 136 i inne

Jest: „posiada” powinno być „ma”

- ss. 30,131, 121, 154

Jest: „środowisko naturalne” powinno być: „środowisko przyrodnicze”

- s. 43

Jest: „przepływ materii w środowisku” powinno być: „obieg materii w środowisku”

- s. 125, Rys.25 A

Błędny opis osi rzędnych; jest „Liczba żywych komórek w 1 ml osadu” powinno być „Ogólna liczba komórek bakterii w 1 ml osadu.”

- Ponadto w rozprawie zabrakło wyników określających biomasę komórek bakteryjnych oraz wartości stosunku liczby bakterii z aktywną błoną komórkową (żywych) do liczby bakterii z nieaktywną błoną komórkową (martwych) co Autor zapowiada w części metodycznej rozprawy (Rozdz. 3.13.2).

Wniosek

Doktorant po raz pierwszy przeprowadził badania nad występowaniem i oceną stężeń pozostałości antybiotyków należących do tetracyklin, sulfonamidów, chinolonów oraz trimetoprimu w osadach dennych południowego Bałtyku.

Na podstawie wyników własnych badań zweryfikował postawioną hipotezę, iż: „osady południowego Bałtyku i bytujące w nich mikroorganizmy są narażone na obecność zanieczyszczeń z grupy antybiotyków”.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Grzegorza Siedlewicza spełnia wymagania zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Na podstawie całości rozprawy stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Grzegorza Siedlewicza do publicznej obrony.