

Gdańsk, 05.05.2014 r.

prof. hab. dr inż. Agata Kot-Wasik

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny

Politechnika Gdańska

RECENZJA

pracy doktorskiej autorstwa mgr Grzegorza Siedlewicza zatytułowanej "Pozostałości antybiotyków w osadach dennych południowego Bałtyku – stężenia i wpływ na bakteriocenozę"

wykonanej w Instytucie Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie
pod kierunkiem dr hab. Kseni Pazdro, prof. nadzw. IO PAN

Morze Bałtyckie jest szczególnym morzem: młodym, niedużym, mało zasolonym, prawie zamkniętym i płytkim, a do tego narażonym na różne zanieczyszczenia. Jego zlewisko zajmuje powierzchnię równą około 17% całkowitej powierzchni kontynentu europejskiego. Morze Bałtyckie stanowi ujście dla ponad 250 rzek. Jedną z przyczyn dużej wrażliwości Morza Bałtyckiego na zanieczyszczenia jest powolna wymiana jego wody. Substancje zanieczyszczające wprowadzone do morza pozostają w nim dłużej niż w innych obszarach morskich. Szkodliwe, toksyczne substancje gromadzą się w wodzie, w osadach dennych i w żywych organizmach. Stosunkowo niska temperatura morza sprawia, że ich rozkład zachodzi powoli.

Problematyka badawcza przedłożonej do zaopiniowania pracy Pana mgr inż. Grzegorza Siedlewicza związana jest z oceną narażenia osadów dennych południowego Bałtyku i

bytujących tam mikroorganizmów na obecność pozostałości wybranych antybiotyków (w tym sulfonamidów, chinolonów, tetracyklin i trimetoprimu). Ten ambitny nadrzędny cel wymagał opracowania procedur analitycznych umożliwiających pozyskanie miarodajnych informacji na temat zawartości pozostałości antybiotyków w próbkach bałtyckich osadów dennych, zbadania wpływu właściwości fizykochemicznych badanych związków oraz czynników środowiskowych na występowanie pozostałości antybiotyków w badanych osadach dennych oraz określenie wpływu oznaczonych pozostałości antybiotyków na bakterie bytujące w osadach Bałtyku.

Podjętą tematykę badań uważam za zadanie nie tylko trudne i ambitne, ale ze wszystkich stron zasadne. Zaś główne cele przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Autor na samym początku jasno określił i uzasadnił.

Licząca 178 stron rozprawa doktorska ma klasyczny układ, na który składa się pomocny wykaz stosowanych skrótów i akronimów, trzy-stronicowe wprowadzenie, cel i zakres pracy, część teoretyczna (obejmująca 38 stron), po której to następuje część doświadczalna, zajmująca 26 stron. Kolejna część to obszerna, zajmująca 48 stron część dokumentująca wyniki oraz najbardziej istotną pod względem naukowym - 30-stronicową interpretację i dyskusję wyników. W dalszej części pracy Doktorant zamieścił czterostronicowe podsumowanie i streszczenie w anglojęzycznej wersji oraz bardzo bogaty spis literatury obejmujący aż 239 pozycji. Oceniana rozprawa doktorska zawiera 28 rysunków oraz 28 tablic.

W zwięzłym wprowadzeniu mgr Grzegorz Siedlewicz przybliży czytelnikowi problematykę związaną z zagrożeniami związanymi z obecnością antybiotyków w środowisku, w efekcie czego czytelnik nie ma wątpliwości co do konieczności prowadzenia monitoringu pozostałości antybiotyków.

Część teoretyczna pracy została poświęcona zagadnieniom dotyczącym szczegółowej charakterystyki badanych związków, wnikliwemu przedstawieniu źródeł i losu środowiskowego antybiotyków, charakterystyki południowego Bałtyku, który został objęty monitoringiem, bakteriocenozy osadów Bałtyku, a na koniec metodyk analitycznych mających zastosowanie w analizie antybiotyków w próbkach środowiskowych. Mogę podkreślić, iż ta część pracy doktorskiej mgr Grzegorza Siedlewicza została poprawnie zredagowana i zilustrowana, dzięki czemu umiejętnie wprowadza czytelnika w całość

zagadnień przedstawianych w dalszej części pracy. Chciałabym jednak w tym miejscu zwrócić uwagę na pewne drobne niedociągnięcie, mianowicie na stronach 51/52 przedstawiono charakterystykę sposobów izolacji antybiotyków z próbek środowiskowych ze szczególnym uwzględnieniem techniki SPE, która niewątpliwie jest obecnie najpowszechniej stosowaną techniką izolacji związków organicznych, jednakże abrakło mi tutaj przedstawienia jej modyfikacji znanej pod nazwą QuEChERS.

Na część doświadczalną pracy składa się wyczerpujący i zarazem zwięzły opis rozmieszczenia stacji badawczych, sposobu pobierania próbek oraz omówienie przeprowadzanych oznaczeń, w tym wilgotności osadów, zawartości materii organicznej, uziarnienia, zawartości całkowitego węgla organicznego, stężenia rozpuszczonego węgla organicznego w wodach przydennych i porowych osadów, a także zawartości pozostałości antybiotyków w osadach morskich. Autor przedstawił wnikliwie opracowane procedury analityczne, w przypadku metodyk analitycznych omówienie dotyczyło każdego z etapu, czyli izolacji, wzbogacania, oczyszczania i analizy z zastosowaniem techniki SPE oraz HPLC – MS/MS. Wszystkie stosowane procedury analityczne były poddawane optymalizacji, a następnie wewnątrz-laboratoryjnej walidacji. Oceniając tę część eksperymentalną pracy można podkreślić, iż badania zostały poprawnie zaplanowane i przygotowane, zaś warsztat analityczny nie budzi jakichkolwiek zastrzeżeń. Zastanowił mnie jednakże aspekt optymalizacji warunków ekstrakcji i analizy prowokując moje zapytanie: czy na etapie optymalizacji warunków ekstrakcji i analizy stosowano metody planowania (np. Simpleks, plany *Boxa-Behnkena*) ?

Ponadto, podczas czytania tej części Rozprawy Doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania:

- strona 88 (*Rys. 11*): na chromatogramach LC-MS/MS uzyskanych podczas analizy zawartości tetracykliny i oksytetracykliny w osadach z różną zawartością materii organicznej piki pochodzące od analitów ogonują; jak – z chromatograficznego punktu widzenia – można zminimalizować takie ogonowanie, w jaki sposób ogonowanie wpływać może na analizę ilościową, co powoduje, iż dla niektórych analitów następuje ogonowanie, a dla innych nie ?

- strona 90, 92 i 93 (Tabl. 14, 15, 16): stosuje Pan opis *Liniowość*, ale tej kolumnie przypisuje Pan skrót r^2 tłumacząc go jako współczynnik determinacji. Jaka jest różnica pomiędzy współczynnikiem korelacji liniowej r a współczynnikiem determinacji r^2 ?
- strona 92 (Tabl. 15): wartości MDL i MQL dla kwasu oksolinowego znacząco odbiegają od pozostałych. Czy taka odbiegająca wartość dla samego układu chromatograficznego (LOD, LOQ) również była obserwowana ? Czy nie można by jej powiązać z właściwościami fizyko-chemicznymi analitu (np. LogP) ?

Podsumowując różne aspekty opracowanej i zastosowanej przez Doktoranta metodyki analitycznej chciałabym zaznaczyć, iż opracowana metodyka umożliwia oznaczanie antybiotyków z różnych grup i charakteryzuje się dobrymi parametrami walidacyjnymi, jakkolwiek żałuję jedynie, iż nie zastosowano metody wzorca wewnętrznego.

Następnie przeprowadzono badanie sorpcji antybiotyków do osadów, a także ich wpływu – i to zarówno pojedynczych antybiotyków, jak i mieszaniny wybranych z nich - na bakterie wyizolowane z osadów bałtyckich, a w tym na wzrost bakterii, na liczbę komórek bakteryjnych, na liczbę bakterii z aktywną błoną komórkową. Całość wyników poddana została opracowaniu statystycznemu, które nie budzi moich zastrzeżeń, ale ta część pracy doktorskiej nasunęła mi następujące uwagi:

- strona 97 (Tabl. 17): skoro antybiotyków SP, SPZ, SMT, ENR nie wykryto w żadnej z próbek, to → czy są one stosowane w Polsce; → czy są one trwałe; → czy są szybko metabolizowane; → czy ulegają rozkładowi?
- Strona 103: cyt. „*Sulfametoksazol to najczęściej wykrywany związek z grupy sulfonamidów...*”. Czy wiadomo jest coś o jego zastosowaniu na Wybrzeżu ? Czy może jego pozostałości napływają z wodami rzek ?
- Strona 106: cyt. „*Trimetoprim stanowi następny po sulfametoksazolu najczęściej wykrywany związek w analizowanych próbkach osadów*”. Trimetoprim jest zwykle łączony z sulfametoksazolem, może właśnie dlatego oba wykrywano w około 50% analizowanych próbek.
- Strona 112: cyt. „*Uzyskane wyniki wskazują, że sulfonamidy i trimetoprim w swoich najwyższych stężeniach znajdują się w głębszych warstwach rdzenia. Liniowa szybkość sedymentacji dla Głębi Gdańskiej wynosi ok. 0,12 cm/rok, co wskazywałoby*

na obecność pozostałości farmaceutyków w ponad 100-letniej warstwie osadu". Czy jest możliwe, aby 100 lat temu te antybiotyki były już wprowadzane do środowiska Głębi Gdańskiej?

W wyniku przeprowadzonych badań Pan mgr Grzegorz Siedlewicz uzyskał duży zbiór danych pomiarowych określających zmienność przestrzenną i czasową stężeń pozostałości antybiotyków w osadach południowego Bałtyku. Jednocześnie uzyskane wyniki porównane zostały z tymi, jakie dostępne są dla innych akwenów morskich. Wyniki badań stały się podstawą do przeprowadzenia oceny ryzyka ekotoksykologicznego zidentyfikowanych antybiotyków, opisu wpływu pozostałości antybiotyków na bakteriocenozę południowego Bałtyku. Bardzo podoba mi się krytyczne podejście Doktoranta do stosowanej metody przygotowania preparatów, metody powszechnie stosowanej do próbek wody, osadów rzecznych i ścieków podczas określania ogólnej liczby bakterii (strona 127, ostatni akapit podrozdziału 4.5.2.1). Dobrze, że zaobserwowany duży rozrzut wartości uzyskany w przypadku tego samego preparatu nie został wytłumaczony teorią „na siłę” celem usprawiedliwienia otrzymanych wyników. Obiektywizm pracownika naukowego jest istotną i pożądaną cechą.

W konsekwencji cel badań został zrealizowany, a zwieńczeniem rozprawy jest dyskusja: rzeczowa, merytorycznie poprawna i wyczerpująca. W tej części rozprawy doktorskiej zwróciłam uwagę tylko na jedną pewną niezgodność, mianowicie na stronie 130 za przyczynę faktu, iż enrofloksacyna jest sporadycznie wykrywana w próbkach morskich osadów dennych uznano podatność antybiotyku na degradację i sorpcję w środowisku śródlądowym, podczas gdy w akapicie wcześniej na stronie 129 stwierdzono, iż właściwości fizykochemiczne związków w dużo mniejszym stopniu wpływają na występowanie antybiotyków w środowisku niż ich zużycie.

Zwiewczeniem rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Siedlewicza jest rzeczowe podsumowanie oraz poprawnie sformułowane i ciekawe wnioski końcowe płynące z wszystkich otrzymanych wyników. Całość pracy zamyka imponująca część literaturowa licząca aż 239 pozycji.

Oceniając działalność publikacyjną Pana mgr Grzegorza Siedlewicza chciałabym podkreślić fakt, iż uzyskiwane wyniki stały się podstawą do przygotowania 3 publikacji naukowych (*Analytical Methods*, 3: 1371-1378, 2011 IF=1,855; *Oceanological and Hydrobiological Studies* 41: 64-78, 2012 IF=0,400; *J. Chromatogr. A* 1304:138– 146, 2013; IF=4,612), a zdobyta wiedza i doświadczenie zaowocowały trzema rozdziałami w książkach (wydanych przez Springer oraz Oficynę Wydawniczą PWR). Ponadto mgr Grzegorz Siedlewicz brał czynny udział w trzech projektach badawczych: „Preludium” NCN Nr. 2011/01/N/ST10/06977 „Pozostałości antybiotyków w osadach dennych południowego Bałtyku - stężenia i wpływ na bakteriocenozę” ; „ANTYB” WFOŚiGW ” Zanieczyszczenie osadów dennych Zatoki Gdańskiej aktywnymi biologicznie związkami z grupy antybiotyków” ; polsko-hispański wspólny projekt badawczy (PAN/CSIC). „Stężenia, przemiany i wpływ na biocenozę pozostałości leków w morskich ekosystemach przybrzeżnych na przykładzie Zatoki Gdańskiej i Zatoki Kadyks” .

Do całego tego dorobku należy włączyć jeszcze liczne wystąpienia (3 referaty i 13 posterów) na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Na zakończenie recenzji chciałabym dodać, iż Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem naukowym, jednakże Autor nie uniknął drobnych błędów o charakterze interpunkcyjnym i językowym. Poniżej pozwalam sobie zatem wyszczególnić nieliczne dostrzeżone błędy:

1. w całej pracy pomijane są przecinki
2. słowo: „koncentracja” zastąpić proponuję polskim odpowiednikiem „stężenie”
3. strona 72 (*Tabl. 10*): amplitudę fragmentacji wyrażono w [V], jednakże amplitudę wyraża się w, zaś jednostki [V] opisują napięcie.
4. strona 82 (*drugi akapit*): zdanie cyt. *Analizowane osady w 66% charakteryzowały się wilgotnością poniżej 50%* powinno raczej brzmieć: *66% analizowanych osadów charakteryzowało się wilgotnością poniżej 50%* .
5. strona 84 (*Tabl. 13*): brak wyjaśnienia co oznacza „-” ; zastosowane jednostki PSU zastąpiłabym jednostkami SI (promile lub %).
6. strona 87 (*Rys. 10*): szkoda, że na chromatogramie LC-MS/MS w trybie MRM nie podano nazw analitów
7. strona 89 (*pierwszy akapit*): sformułowanie cyt. *„najefektywniejszej metody izolacji”* zastąpiłabym mniej kategoriycznym *„efektywnej metody izolacji”* .
8. Strona 96/9798 (*Tabl. 17*): jaka jest różnica pomiędzy zastosowanym określeniem „< MDL” a skrótem „n.a.” ?

9. strona 117 (Rys. 22): zamiast zastosowanego opisu (18C) lepiej byłoby zastosować opis (pkt 18C).
10. strona 129: zdanie cyt. „*Garcia-Galan i in. (2010a) stwierdzili że właściwości fizykochemiczne związków ...*” jest powtórzone na następnej stronie.

Jednocześnie chciałabym podkreślić, iż ww. usterki nie wpływają na ogólną, wysoką ocenę merytoryczną przedstawionej pracy. Na wyszczególnienie owych usterek pozwoliłam sobie jedynie z obowiązku Recenzenta.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż praca autorstwa mgr inż. Grzegorza Siedlewicza zatytułowana "Pozostałości antybiotyków w osadach dennych południowego Bałtyku – stężenia i wpływ na bakteriocenozę" wykonana w Instytucie Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie pod kierunkiem dr hab. Kseni Pazdro, prof. nadzw. IO PAN w mojej ocenie **spełnia aktualne wymagania merytoryczne i formalne Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym, w związku z czym wnoszę więc o dopuszczenie mgr inż. Grzegorza Siedlewicza do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę fakt, iż przedstawiona mi do recenzji Rozprawa doktorska świetnie wpisuje się we współczesny nurt badań istotnych i wzbudzających szerokie zainteresowanie wśród naukowców zajmujących się zagadnieniami chemii i ekotoksykologii morza oraz ze względu na nowatorski charakter otrzymanych wyników badań **wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr Grzegorza Siedlewicza.**

Prof. dr hab. inż. Agata Kot-Wasik