

Dr hab. Magda Caban, prof. UG
Katedra Analizy Środowiska
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

18.11.2024 r. Gdańsk

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr Jerzego Pogrzeby pt.
„Zastosowanie cyjanobakterii jako biosorbetów do usuwania ksenofarmaceutyków”

promotor pracy: dr hab. Anna Poliwoda, prof. UO

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Chemii Uniwersytetu Opolskiego. Praca zajmuje 110 stron. Składa się kolejno z przeglądu literatury (30 stron), celu pracy (2 strony), części doświadczalnej (10 stron), wyników i dyskusji (40 stron), podsumowania w języku polskim i angielskim (3 strony), wniosków (1 strona), spis literatury (241 pozycje). Proporcja kolejnych części jest właściwa. Pozwolę sobie przedstawić kolejne części, jednocześnie komentując i wskazując główne możliwości poprawy przedstawionej do oceny rozprawy.

Rozpocznę od tytułu rozprawy doktorskiej. Zarówno w języku polskim, jak i angielskim nie istnieje określenie ksenofarmaceutyki. Owszem istnieje określenie ksenobiotyki (jako substancje obce organizmom) oraz przykładowo kseno-estrogeny, jednak wydaje się bardziej zasadne użycie po prostu słowa farmaceutyki w tytule rozprawy. W części z przeglądem literatury początkowo Autor używa poprawnie określenia aktywne substancje farmaceutyczne. Następnie zastępuje je słowem leki. Natomiast ostatecznie używa określenia ksenofarmaceutyki. Należałoby konsekwentnie używać jednego z określeń, przy czym według nomenklatury używanej przez wydziały chemiczne uniwersytetów medycznych najbardziej poprawne jest określenie aktywne substancje farmaceutyczne. Z przyczyn logistycznych w pracy można by skrócić to określenie do słowa farmaceutyki.

W części literaturowej znajduje się opis farmaceutyków, przyczyn ich dostawania się do środowiska, przy czym rozdział kończy się opisem farmakologicznym niesteroidowych leków

przeciwzapalnych używanych jako anality w pracy. W kolejnym rozdziale bardzo ogólnie opisano szkodliwość leków przeciwbólowych dla ludzi i innych organizmów przy czym nie znalazłam informacji o szkodliwości leków właśnie dla ludzi. Przykładowo, diklofenak przy nadmiernej podaży może uszkadzać nerki, co było także przyczyną wyginięcia sępa azjatyckiego - warto taką informację byłoby przedstawić w pracy. W następnym rozdziale przedstawiono bio-sorbenty i ich podział. Opis jest zgrabny i dzieli je pod względem mechanizmu na pasywne i aktywne. Ponadto przedstawiono mechanizmy bio-sorpcji na przykładzie metali i komórek bakteryjnych. W kolejnym rozdziale przedstawiono zastosowanie bio-sorbentów. W tym miejscu moja główna uwaga to możliwość znacznego skrócenia szczególnie o metale a rozszerzenie części opisu bio-sorpcji leków. Rozdział 1.6 przedstawia sinice jako mikroorganizmy o wysokim potencjale wykorzystania, co wynika z budowy ich zewnętrznych powłok. Ponadto przedstawiono główne barwniki i ich rolę zarówno w procesach fotosyntezy, jak i obniżania stresu oksydacyjnego.

Konkretne uwagi do części literaturowej:

- „Nadmierne spożycie leków często prowadzi do wydalania ich nadmiaru z moczem” każde spożycie leków powodować może uwalnianie frakcji niezmienionej z moczem.

- Autor opisuje zwiększające się stężenia leków w wodach naturalnych. Nie zgadzam się z tym stwierdzeniem, nie ma literatury potwierdzającej ten fakt. Mamy natomiast coraz więcej danych, ponieważ przeprowadzamy więcej akcji monitoringowych.

- Na stronie 10 zamiast produkcja zwierząt hodowlanych można napisać hodowla zwierząt.

- Rysunek 1 nieprawidłowo przedstawia strzałkami kierunek przedostawania się leków, w szczególności z oczyszczalni ścieków bezpośrednio do człowieka - nie rozumiem tej ścieżki.

- Nie należy w tytułach tabel i rysunku używać kropek, podobnie jak w każdym innym tytule w języku polskim.

- Na stronie 11 pada stwierdzenie o wydalaniu z moczem leków w postaci niezmienionej jako koniugaty, natomiast te postacie to formy zmienione.

- Na stronie 13 znajduje się zdanie „pozostałe 10% działają celowo na przykład poprzez wchłanianie przez skórę”. Jest to zdanie niejasne.

- W rozdziale 1.2 opisano szkodliwość leków dla organizmów wodnych, jednak nie padło tu stwierdzenie dotyczące kluczowej roli stężenia i oceny ryzyka wynikającego ze stężenia.

- W rozdziale 1.3 pada stwierdzenie o braku efektywnych sposobów usuwania leków na etapie oczyszczania ścieków. Jest to stwierdzenie nieprawdziwe, ponieważ posiadamy szereg technologii tak zwanego zaawansowanego oczyszczania ścieków, które co prawda nie są powszechnie stosowane, jednak potrafią całkowicie usunąć mikro-zanieczyszczenia ze strumienia ścieków, szczególnie oczyszczonych.

- Następnie w tym rozdziale pada stwierdzenie o konieczności usuwania leków bezpośrednio ze środowiska naturalnego. Nie zgadzam się z tym stwierdzeniem. W środowisku leki ulegają usuwaniu poprzez procesy biotyczne i abiotyczne i nie ma ekonomicznego uzasadnienia usuwania ich w środowisku naturalnym, działać należy na końcu lub na początku rury.

- Proszę o komentarz co do stosowania sorbentu syntetycznych w oczyszczaniu ścieków, z mojej wiedzy sorbenty tego typu nie są zasadne do stosowania w technologiach komunalnych.

- Poczynając od części literaturowej zauważam problem z cytowaniem publikacji. Przykładowo na stronie 15 pojawiają się 2 cytowania, których brak w spisie treści [Shuguang, 2015; Deng 205]. Na stronie 25 jest [Kasowska-Zok 2014], brak jest tej pozycji w literaturze. Podobne błędy zauważyłam w innych rozdziałach. Ponadto w tekście literatura przedstawiana jest jako autor + rok, natomiast w spisie literatury oprócz kolejności alfabetycznej zastosowano również numeryczną. Jest to stylistycznie niepoprawne. W kilku miejscach napotykam problem, że cytowana literatura nie jest odpowiednia. Przykładowo [Cumbers, 2014] nie opisuje możliwości przetrwania sinic na powierzchni Marsa - należałoby tutaj znaleźć literaturę pierwotną.

- Na stronie 16 podano, że główną wadą sorbetów pasywnych są wysokie koszty energetyczne i finansowe na wytwarzanie posiłkuje się tutaj autor literaturą z 1988 roku. Obecnie przykładowo węgiel aktywny jest absorbentem powszechnie stosowanym także na dużą skalę, którego koszty produkcji zostały obecnie bardzo zredukowane.

- W opisie mechanizmów bio-sorpcji do bakterii zabrakło mi opisu jednego z najbardziej poznanych mechanizmów, to jest przedostawania się antybiotyków do komórek bakteryjnych.

Dostępna jest w tym przypadku literatura przeglądowa, którą można by zacytować nie wydłużając tym sposobem pracy.

- Proszę autora o zdefiniowanie określenia mikro-algi; pojawia się ono w literaturze anglojęzycznej, natomiast ciekawi mnie interpretacja autora.

Celem przedstawionej do oceny pracy była “ocena zdolności wybranych gatunków cyjanobakterii do bio-sorpcji i/lub transformacji wybranych farmaceutyków obecnych w mediach hodowlanych oraz zbadanie wpływu tych związków na metabolizm sinic. Po celu pracy pojawiają się hipotezy jakoby sinice wykazywały zdolność do efektywnej bio-sorpcji farmaceutyków, proces bio-sorpcji oraz wpływ farmaceutyków na sinice różni się w zależności od gatunku i rodzaju związku chemicznego, a farmaceutyki mają wpływać na metabolizm sinic, przez co zmieniają skład barwników komórkowych. Zauważam tutaj duży problem pracy. Część literaturowa powinna być skonstruowana tak aby podeprzeć zasadność podjęcia problemu badawczego oraz stawianych hipotez badawczych. Natomiast w części literaturowej nie znalazłam opisu sinic jako skutecznych sorbentów leków, w szczególności z grupy NLPZ. Nie znalazłam także opisu wpływu farmaceutyków na metabolizm sinic oraz tego, że leki zmieniają składy pigmentów. Skąd pomysł na leki z grupy nlpz i wybrane gatunki sinic? Czy wykazały one wcześniej zdolność do desorpcji? Czy leki z grupy nlpz nie są usuwane innymi technikami? Czy najlepszym sposobem określenia metabolizmu sinic jest pomiar barwników czy może jednak badania biomarkerów enzymatycznych? Proszę autora o podanie przesłanek do podjęcia się tego konkretnego zadania badawczego. Badania naukowe prowadzi się tak, że najpierw przeprowadzane są badania wstępne lub znajdowane są przesłanki literaturowe do podjęcia się problemu.

W części eksperymentalnej przedstawiono użytą aparaturę i odczynniki. Nie znalazłem natomiast opisu czystości zakupionych leków oraz ich formy, również w publikacji będącej efektem pracy. Przykładowo, **diklofenak** popularnie stosuje się jaką sól sodową o bardzo dobrej rozpuszczalności w wodzie. Natomiast w kolejnych częściach autor sugeruje bardzo niską rozpuszczalność leków, w związku z czym stosować musiał aceton. Tutaj także uwaga, że należałoby przeprowadzić kontrolę rozpuszczalnikowe a nie arbitralnie stwierdzić o braku jego toksyczności dla sinic. W kolejnych częściach opisu metodyki przedstawiono procedurę pracy z sinicami,

przygotowanie mediów hodowlanych, eksperyment ekspozycyjny na leki 3 gatunków sinic, sposób kontroli ich wzrostu, metodę oznaczeń 3 rodzajów barwników. Opisano również w sposób oznaczenia leków w mediach hodowlanych, izolacji z powierzchni oraz wnętrza komórek, przygotowanie próbek i analiza za pomocą mikroskopu elektronowego, badanie toksyczności płynów pochodzących wobec wioślarki oraz dwóch gatunków glonów zielonych. Konkretne uwagi do części eksperymentalnej:

- W opisie zestawu HPLC wskazano odgazowanie próbki, chodzi tutaj raczej o odgazowanie fazy ruchomej w trybie online.

- **Jak** wybrano stężenia leków? Rozumiem, że ideą było wzięcie takich stężeń, które nie działał toksycznie na sinice. Jak więc wyznaczono te stężenie?

- Podano 4 długości fali, natomiast liczba analitów to 3.

- **Głównym** narzędziem detekcji był spektrometr mas typu Q-TOF. Spektrometr wysokorozdzielczy Q-TOF daje możliwość oceny dokładnej masy cząsteczkowej. Nie znalazłam opisu tego typu eksperymentów.

- W całej pracy znalazłam niespójność stosowania jednostek w szczególności do objętości, czasem są to bowiem centymetry sześciennie a czasem mililitry.

- **Nie** znalazłam opisu przeprowadzania kontroli biotycznych i abiotycznych. W przypadku leków z grupy NPLZ oraz długiej ekspozycji szczególnie istotne jest przeprowadzenie kontroli abiotycznych, w których lek dodawany jest do wody i sprawdzana jest jego trwałość hydro-lityczna i foto-lityczna.

- **Nie** znalazłam wzoru opisującego współczynnik wzrostu. Współczynnik ten według norm ECD 201 wyliczany jest jako „grow rate” w ściśle określony sposób. Dzięki temu wykazać można czy sinice w kulturach kontrolnych przyrastały odpowiednio szybko; to jest czy w trakcie eksperymentu zastosowano optymalną temperaturę, naświetlenie a biogeny były dostępne przez całą ekspozycję. Proszę o podanie „grow rate” i jego skomentowanie w porównaniu do innych prac naukowych.

- **Za** dużą wadę opisu metodologii uważam brak cytowania literatury do podparcia metody oznaczenia 3 rodzajów barwników. Standardowo do ekstrakcji lipofilnych pigmentów stosuje się

aceton + heksan, natomiast w tym przypadku do ekstrakcji użyto roztworu wodno-metanolowego, który wydaje się nie w pełni ekstrahować hydrofobowe chlorofile. Do ekstrakcji karotenoidów użyto dimetyloformamidu, także w tym przypadku proszę o podanie literatury. Do ekstrakcji fikobiliprotein standardowo używa się wodnych buforów. W pracy użyto natomiast glicerolu, bez podania źródła tej procedury. Nie jestem w stanie ocenić więc czy zastosowana metoda analizy barwników jest prawidłowa. Użyte wzory mogą odnosić się do innego typu komórek niż sinicy, co jak wykazał autor w części literaturowej, może mieć wpływ na efektywność ekstrakcji w związku z różnicą budowy komórek roślinnych i bakteryjnych. Z mojego doświadczenia wynika, że aby efektywnie wydzielić barwniki zarówno rozpuszczalne w wodzie, jak i rozpuszczalne w tłuszczach należy ekstrakcję wspomóc przykładowo ultradźwiękami lub homogenizacją kulkową. W przypadku fikobilin efektywne było na przykład dodanie enzymów rozkładających ścianę komórkową. Proszę o komentarz autora jak oceniono efektywność ekstrakcji barwników, co wydaje się kluczowe, ponieważ ich zawartości były głównym parametrem do oceny wzrostu i metabolizmu sinic.

- **Rozdział 3.4.1.** Opisuje wydzielenie pozostałości leków z płynów pochodowlanych. Zastosowano tu niestandardową procedurę, gdyż taką jest ekstrakcja do fazy stałej. W tym przypadku autor zdecydował się na liofilizacji dużych objętości mediów i ekstrakcje analitów za pomocą octanu etylu. Proszę o podanie źródła tej procedury oraz o sposób oceny odzysku. To samo dotyczy ekstrakcji leków z powierzchni oraz z wnętrza komórek. Bez odpowiedniej oceny odzysku dane ilościowo uzyskane w ten sposób nie są wiarygodne. Należałoby użyć na przykład wzorców znakowanych izotopowo oraz przeprowadzić serię eksperymentów optymalizacji ekstrakcji.

- **W opisie** eksperymentów z wioślarkami oraz z jednokomórkowymi glonami zielonymi zabrakło mi powołania się na odpowiednie procedury referencyjne. Dostępne są one zarówno dla organizmów *Daphnia magna*, jak i dla glonów zielonych. Definiują one długość trwania eksperymentów na toksyczność ostrą oraz toksyczność chroniczną. Dane uzyskane za pomocą procedur referencyjnych porównać można do danych literaturowych. Szczególnie w przypadku wioślarki i leków przeciwzapalnych dane te są łatwo dostępne.

Część wynikowa podzielona jest na w części odpowiadające chronologicznie częścią eksperymentalnym.

Pierwszy rozdział opisuje optymalizację metody analitycznej oznaczenia badanych farmaceutyków. W mojej opinii analiza leków przeciwzapalnych nie jest nowością naukową, gdyż została przedstawiona niejednokrotnie wielu publikacjach naukowych. Tytuł powinien raczej nazywać się wybór warunków oznaczeń, gdyż optymalizacja to znacznie szersze pojęcie. W pierwszym akapicie przedstawiono informację, że optymalizowano przykładowo prędkość fazy ruchomej natomiast wyników takich nie znalazłam, podobnie wybierano rozpuszczalnik dla analizowanych próbek co jest niejasne, także w tym przypadku nie znalazłam wyników.

Inne szczegółowe uwagi do części wynikowej:

- **W jakim** celu w analizie chromatograficznej stosowano dwa modyfikatory organiczne, to jest metanol i acetonitryl. Z mojego doświadczenia sam acetonitryl świetnie rozdziela diklofenak i ibuprofen, jeśli jest odpowiednio dobrany gradient.

- **Czym** różniły się użyte kolumny? Czy było zasadne porównywanie 2 kolumn pomiędzy sobą?

- **Jako** że jako sama pracuję z lekami przeciwzapalnymi dobrze znam metodykę HPLC ich oznaczania. W związku z tym nasuwa mi się szereg pytań. Po pierwsze paracetamol ma pik na widmie UV-Vis w okolicach 240 nanometrów. Natomiast na rysunku 8 przedstawiono, że większa absorbancja dla tego analitu występuje przy długości fali 270 a nie 238 nm. Proszę o podanie widm poszczególnych związków w badanym układzie faz. Proszę o przedstawienie chromatogramów dla analiz osobnych analitów, samego medium BG 11 w kontrolach biotycznych bez leków.

- **Mam** również uwagi dotyczące analizy MS. Proszę o podanie całkowitych prądów jonowych oznaczania analitów w mieszaninie oraz osobno. Ibuprofen faktycznie oznacza się jedynie w trybie jonów ujemnych, w postaci jonu pseudomolekularnego $[M-H]^-$. Natomiast przedstawiono jon pseudomolekularny z grupą kwasu octowego, chociaż jako dodatek do fazy ruchomej stosowano kwas mrówkowy i takich adduktów można by się spodziewać. Którego jonu użyto to analizy ilościowej ibuprofenu? Opisano, że wyznaczono wpływ efektu matrycowego, jednak go nie opisano co w przypadku analizy w ekstraktach jest kluczowe. Nie jestem w stanie ocenić poprawności analizy

z detektorem MS, ponieważ nie podano, które wartości m/z zostały wzięte do analizy ilościowej oraz jakie były granice detekcji tą techniką. Nie podano tabel z parametrami walidacyjnymi.

W kolejnych rozdziałach opisano wpływ leków na wzrost sinic oraz ich zdolność do biosorbcji.

Proszę o podanie zasadności stosowania 21-dniowego eksperymentu, w trakcie którego należy dostarczać zarówno światła, jak i biogenów aby podtrzymać wzrost sinic. Z punktu widzenia technologicznego nie taki proces nie byłby opłacalny.

Proszę o podanie literatury do następujących stwierdzeń:

-„Tę interesującą zależność można wyjaśnić tym że w odpowiedzi na jaśniejszy czynnik stresowy komórki sinic uruchamiają dodatkowe mechanizmy obronne co prowadzi do przyspieszenia tempa wzrostu hodowli.”

-„Mechanizm ten jest reakcją obronną cyjanobakterii, które przyspieszają swój rozwój w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiskowe”

-„, Związki o charakterze hydrofobowy mają tendencję do gromadzenia się na powierzchni komórek, co może ułatwić ich adsorpcję”

-„,Dodatkowo istnieją dowody na to, że niektóre gatunki sinic mogą w warunkach stresowych przejawiać heterotroficzny metabolizm, co może sugerować, że ksenofarmaceutyki są włączane w ich szlaki metaboliczne”.

Poprawić należy opis rysunków przedstawiających udział wybranych barwników w komórkach sinic. Na rysunkach tych na osi y jako jednostkę podano procentowy udział barwników w komórkach sinic. Wydaje się logiczne, że każdorazowo udział taki powinien wynosić 100%, natomiast wielu przypadkach wartość ta znacznie odbiega do 100 bądź wynosi nawet zero, co można interpretować tak, że w komórkach się nic nie było barwników. Proszę o podanie sposobu obliczenia procentowego udziału barwników w komórkach sinic.

- **Nie** jest jasne w jakich jednostkach określono zawartość barwników w kulturach. Czy była to masa barwnika na masę lub objętość hodowli? Jeśli była to zawartość miligramów barwników na objętość hodowli jasne jest, że w przypadku zwiększonej biomasy na objętość kolonii w ekstrakcie

będzie większa ilość barwników. Wyniki takie nie mogą być więc uznane jako dowód na wzrost lub obniżenie procesów metabolicznych w komórkach sinic, świadczą jedynie o większej biomacie.

W przypadku Anabeny oraz Spiruliny dostępne są dane literaturowe co do zawartości barwników, nie zostały natomiast tu przytoczone. Dla Anabeny wynika, że udział chlorofilu w stosunku do fikobilin jest bardzo mały, nie potwierdza tego literatura. Sugerować to może, że proces ekstrakcji chlorofilu był nieprawidłowy, to jest użyto zbyt polarnego rozpuszczalnika metanolu.

- **Jakie** były rzeczywiste stężenie początkowe analityków oraz jak liczone efektywność desorpcji? Warto przeprowadzić bilans masowy porównując masę wprowadzoną a masę odzyskaną w trakcie trwania eksperymentu. Ponadto, w publikacji, która powstała jako efekt rozprawy, we wzorze na efektywność usuwania podana jest powierzchnia sygnału analitu, a nie stężenie. Powierzchnia sygnału nie wzrasta ze stężeniem liniowo, ale względem pewnej proporcji, z pewnym nachyleniem. Nie może być brana jako wyznacznik stężenia.

- Jaka jest zasada budowania konsorcjów sinic, które zamieszkują różne habitaty?

- **Kluczowe** dla określenia rzetelności wyników jest przeprowadzenie lub pokazanie jeśli badania takie zostały przeprowadzone kontrol abiotycznych, to jest samego roztworu wodnego medium hodowlanego z dodatkiem analitu i inkubowanie w takich samych warunkach jak kultury sinic. Szczególnie diklofenak ulega fotolizie, natomiast paracetamol stosunkowo szybkiej hydrolizie. Aby więc stwierdzić, że farmaceutyki usunięte zostały z roztworu poprzez działanie sinic na początek należy wskazać jaki procent masy wprowadzanego związku został usunięty przez procesy abiotyczne.

- Mając na uwadze stężenia leków w testach rzędu od 4 do 50 mg/l nie jest zasadne stosowanie techniki LCMS do oznaczeń końcowych. Tego typu stężenia wprost mogą zostać analizowane techniką HPLC-DAD. Praktycznie limit detekcji dla większości analityków poza ibuprofenem jest mniejszy od 0,1 mg/l.

- **W dyskusji** autor powołuje się na współczynnik lipofilowości diklofenaku i ibuprofenu ($\log P$), które faktycznie wskazują na potencjał bioakumulacyjny. Natomiast w przypadku związków jonizowalnych z grupą karboksylową należy posługiwać się parametrem współczynnik dystrybucji zależnego od pH ($\log D$). Nie podano wartości pH mediów hodowlanych, jednak podejrzewam z własnych doświadczeń, że była pomiędzy 8 a 10. W przypadku obu tych związków $\log D$ przyjmuje

wartość około 0,1, co sugeruje dużą hydrofilowość w warunkach testu. W mediach hodowlanych występują one w postaci anionów są uniemożliwia im dobrą penetrację przez ściany komórkowe, gdyż te także są ujemnie naładowane.

- W części wynikowej mało jest dyskusji wyników z danymi literaturowymi. Szczególnie zabrakło mi porównania wyników do sorpcji leków z wykorzystaniem glonów zielonych i innych konsorcjów bakteryjno-glonowych lub do osadu czynnego.

- Proszę o podanie w jaki sposób mierzono światło docierające do kultur. Światło to jedną z podstawowych czynników wpływających bezpośrednio na wzrost sinic. Jak dobrano wartość natężenia światła? W jakim miejscu go badano?

- Na rysunku 21 jaką jednostkę poddano ilość testowanych farmaceutyków we wnętrzu komórek. Jest to niejasna jednostka gdyż wynika z niej, że ilość analitów mogła być ułamkowa, proszę o poprawę jednostki.

- Czy wyniki przedstawione na rysunku 25 przeczą tym przedstawionym na rysunku 19 i świadczą o małej powtarzalności eksperymentów?

- **Proszę** o komentarz do eksperymentów pożywkach pozbawionych węgla. Rozumiem, że chodzi tutaj o węglany. Należy jednak zaznaczyć że w przeprowadzonych eksperymentach dwutlenek węgla mógł swobodnie dyfundować do fazy wodnej i być źródłem węgla. Można by to sprawdzić kontrolując pH roztworów wodnych w trakcie trwania eksperymentów. Proszę o podanie czy zostało to wykonane. Ponadto dodanie dużej ilości leków w postaci czystych kwasów mogą zmieniać pH mediów co także ma wpływ na wzrost sinic.

- **W pracy** sugeruje się, że sinice częściowo przeszły na heterotrofizm. Jak to się ma to zwiększonej produkcji barwników foto-syntetycznych potrzebnych w procesach autotroficznych. Proszę o podanie literatury porównawczej w tym temacie.

- **W części** eksperymentalnej brak jest opisu sposobu identyfikacji produktów metabolizmu leków. Tak zwana analiza niecelowana jest już powszechnie stosowana, a ponieważ autor posiłkował się Q-TOF mógł wyznaczyć dokładne masy do co najmniej 4 miejsc do przecinka i określić wzory sumaryczne produktów transformacji. Następnie można tych związków szukać innych publikacjach,

przykładowo doi 10.1016/j.scitotenv.2021.148251, w której dla każdego z NLPZ przedstawiono ścieżki metabolizmu przez mikroorganizmy, w tym sinice.

- **Za wadę** pracy uważam przeprowadzenie testów toksyczności z wykorzystaniem rozwielitki i glonów zielonych, gdyż nie zostały one przeprowadzone zgodnie z referencyjnymi procedurami. Nie wyznaczono wartości EC50 dla natywnych związków. Nie porównano tężna z wartościami literaturowymi. Nie określono wpływu PH i natlenienie na żywotność wioślarek. Rozróżnienie zmian w morfologii wioślarek to zadanie dla specjalistów z tej dziedziny, podjęcie się jej przez autora pracy było niezasadne.

- **Dimer** diklofenaku oznaczony w jednym z roztworów pochodowlanych to dowód na to, że zaszła reakcja pod wpływem światła, niezależna od obecności sinic. Przykładowa literatura doi 10.1016/j.chemosphere.2013.06.079. Jeśli autor posiada literaturę potwierdzającą produkcję dimerów przez mikroorganizmy proszą o jej podanie. Nie zgadzam się ze stwierdzeniem na stronie 82 aby obecność dimerów została potwierdzona - taka pewność wymagałaby innego podejścia metodologicznego, przykładowo posiadania wzorca i porównania czasów retencji oraz widm fragmentacyjnych.

- Metabolizm ksenobiotyków często przebiega podobnie w organizmach bakteryjnych i zwierzęcych. W przypadku diklofenaku należałoby więc szukać hydroksy pochodnych dla których wzorce są dostępne.

Podsumowanie:

Rozprawa doktorska Pana mgr Jerzego Pogrzeby przedstawia badania oceny możliwości zastosowania sinic jako bio-sorbetów do usuwania wybranych leków z grupy przeciwzapalnych i przeciwbólowych. Praca jako całość jest spójna i napisana w poprawnym języku naukowym, bez większych błędów językowych. Większość wyników opublikowana jest w jednej pracy naukowej. W mojej opinii główne wnioski z przeprowadzonych eksperymentów nie są dobrze podparte. Poprawić należy szczególnie analizę ilościową zarówno leków, jak i barwników sinic. Dopiero rzetelnie przedstawione wyniki ilościowe mogą służyć do dalszej oceny efektywności sorpcji, akumulacji,

transformacji i bilansów masowych. Praca stanowić może jednak dobre badania wstępne do dalszego wnikliwego poznania tematyki.

W podsumowaniu zabrakło mi ogólnej oceny możliwości stosowania sinic jako bio-sorbetów do usuwania leków. Czy taka technika nadawałaby się do oczyszczania leków w warunkach ścieków komunalnych gdzie nie można zachować warunków septycznych a stężenia leków są na znacznie mniejszych poziomach stężeń niż w badanej pracy? Czy opłacalne byłoby zatrzymanie ścieków na 21 dni? Co zrobić z masą uzyskaną w takim procesie?

Na czarno zaznaczyłam uwagi, do których chciałabym aby Kandydat udzielił odpowiedzi ustnie bądź pisemnie. Resztę uwag proszę traktować jako komentarze pomocne w podniesieniu jakości przyszłej pracy naukowej.

Na dorobek autora składa się jedna praca autorska oraz współautorstwo 2 innych prac. Niestety wyniki nie zostały przedstawione na konferencjach o zasięgu międzynarodowym. Pan magistrant Jerzy Pogrzeba wykazał się działalnością popularyzującą naukę oraz działalnością organizacyjną, odbył kilkudniowy staż w instytucji krajowej, uzyskał także finansowanie wewnętrzne Uniwersytetu Opolskiego na swoje badania.

Praca w mojej ocenie **spełnia wymogi merytorycznych i wymogi formalne Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668) i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.**

Z poważaniem,
dr hab. Magda Caban, prof. UG

KIEROWNIK
Pracowni Analityki i Monitoringu
Środowiska



dr hab. Magda Caban, prof. UG