

Poznań, 31 grudnia 2024 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. Jerzego Pogrzeby

pt. „Zastosowanie cyjanobakterii jako biosorbentów do usuwania ksenofarmaceutyków”

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego - Pana dr. hab. Sławomira Mitrusa, prof. UO z dnia 25 października 2024 r.

Wysokorozwinięta cywilizacja w której żyjemy niesie ze sobą niemało korzyści, ale także dostarcza wielu wyzwań. Jednym z nich są zagrożenia środowiskowe, obecne w powietrzu, glebie, wodzie, czy w żywności, na które jesteśmy codziennie narażeni. Zanieczyszczenia środowiska naturalnego stanowią niezliczoną liczbą związków chemicznych zaliczanych do ksenobiotyków, w tym w głównej mierze różnych leków, np.: hormonalnych, przeciwbólowych, przeciwzapalnych i antybiotyków. Poprzez środowisko kumulują się one na różnych poziomach troficznych, a ostatecznie gromadzą się w organizmach ludzkich i zwierzęcych. Stan zanieczyszczenia środowiska naturalnego związkami organicznymi skłania do znalezienia rozwiązań ograniczających drastyczne i długotrwałe zmiany zachodzące w ekosystemach, pozwalających jednocześnie na ich skuteczną utylizację. Poszukuje się więc nowych metod działania, które pozwolą na poprawę tego stanu rzeczy, a lepsze rozumienie tego typu aktywności pozostają niezwykle aktualne i wciąż potrzebne.

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pana mgr Jerzego Pogrzeby pt.: „Zastosowanie cyjanobakterii jako biosorbentów do usuwania ksenofarmaceutyków” wykonana w Katedrze Chemii Analitycznej na Wydziale Chemii i Farmacji Uniwersytetu Opolskiego pod opieką dr hab. Anny Poliwody, prof. uczelni znakomicie wpisuje się w te potrzeby, a praktyczny jej aspekt jest istotny.

Oceniana dysertacja została w przygotowana w formie tradycyjnej rozprawy doktorskiej i ma układ klasyczny, typowy dla prac eksperymentalnych z dziedziny chemii i nauk pokrewnych. W pracy, liczącej 111 stron, 41 rysunków oraz 6 tabel

zostały zachowane właściwe proporcje części opisującej badania własne w stosunku do części literaturowej i eksperymentalnej.

Na rozprawę składa się sześć zasadniczych rozdziałów: część literaturowa - *Przegląd literatury* (22 str.), *Cel pracy* (2 str.), *Metodologia pracy badawczej* (10 str.), najbardziej obszerna część *Prezentacja i dyskusja wyników* (44 str.), rozdziały końcowe: *Podsumowanie* (3 str.) i *Wnioski* (3 str.). Pracę uzupełniają: umieszczony na początku *Wykaz skrótów* (1 str., pominięty w *Spisie treści*) oraz dołączone w końcowej jej części rozdziały: *Summary* (3 str.) - streszczenie pracy napisane w języku angielskim, *Literatura* - spis cytowanego piśmiennictwa, 242 pozycje bibliograficzne (11 str.), *Spis tabel i rysunków* (2 str.), wykaz *Dorobku naukowego* Doktoranta oraz załącznik - *Suplement* (4 str.), zawierający opisy składników stanowiących media hodowlane stosowane w eksperymentach. Do pracy dołączono również jednokartkową wkładkę w twardej, zafoliowanej oprawie, która zawiera zdjęcia mikroskopowe cyjanobakterii oraz organizmów modelowych, wykorzystanych w badaniach toksyczności, jak również informacje o testowanych ksenofarmaceutykach.

Moją recenzję chciałabym rozpocząć od oceny *Dorobku naukowego* Kandydata do stopnia doktora nauk chemicznych. Pan mgr Jerzy Pogrzeba jest współautorem trzech publikacji, w tym dwóch z tzw. listy filadelfijskiej: *Toxins 2020* oraz *Molecules 2024* (gdzie jest pierwszym autorem), poza tym pięciokrotnie (w tym trzy razy ustnie) prezentował wyniki swoich badań na konferencjach naukowych. Zatem dorobek naukowy Doktoranta można uznać za zadowalający na tym etapie kariery naukowej..

Znajdujący się na początku rozprawy doktorskiej *Wykaz skrótów* zawiera, jak sama nazwa wskazuje, spis zastosowanych w pracy akronimów i symboli w porządku alfabetycznym. Rozdział *Przegląd literatury*, przygotowany został na podstawie pozycji naukowych, co godne jest szczególnego podkreślenia, pochodzących głównie z ostatnich 5-10 lat. W tej części pracy mgr J. Pogrzeba w zwięzły sposób opisał aktualny stan wiedzy na temat szkodliwego wpływu ksenobiotyków na środowisko, ze szczególnym uwzględnieniem leków przeciwbólowych, które nie wykazują działania przeciwzapalnego i narkotycznego (tzw. nieopiodowe leki przeciwbólowe) oraz niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Leki te często dostępne są bez recepty i stanowią bardzo poważne zagrożenie dla organizmów wodnych i lądowych. Znaczna część związków chemicznych z tej grupy przedostaje się do środowiska poprzez ścieki, powodując zanieczyszczenie różnych typów wód oraz gleb. Główne skutki

odziaływania na organizmy wodne, obecnych w środowisku farmaceutyków i ich pozostałości, obejmują zaburzenia pracy enzymów oraz wywoływanie stresu oksydacyjnego. Leki i pozostałości po farmaceutykach są często trudne do usunięcia w procesach oczyszczania ścieków oraz uzdatnianiu wody. Problem zanieczyszczenia lekami przeciwbólowymi i przeciwzapalnymi środowiska stanowi wyzwanie dla współczesnej nauki, aby opracować skuteczne metody ich usuwania i utylizacji.

W dalszej części ocenianej pracy mgr Jerzy Pogrzeba zamieścił szereg danych literaturowych dotyczących metodologii wykorzystania sorbentów syntetycznych, jak i biosorbentów, które mogą w efektywny sposób oczyszczać ścieki z substancji ksenobiotycznych. Nierzadko zdarza się, że zastosowanie sorbentów syntetycznych wiąże się z możliwym wprowadzeniem do środowiska kolejnych zanieczyszczeń (np. mikroplastiku), czy późniejszymi problemami z utylizacją materiału sorpcyjnego, w taki sposób, by nie dochodziło do akumulacji sorbowanych substancji. Bardziej bezpieczną i skuteczniejszą alternatywą wydają się być sorbenty naturalne (biosorbenty), które obejmują materiały pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, a także mikroorganizmy (bakterie, grzyby, mikroalgi), które w naturalny sposób wykazują zdolność do sorpcji różnego rodzaju substancji chemicznych, w tym zanieczyszczeń. Przegląd literaturowy obejmował także omówienie mechanizmu biosorpcji oraz zastosowania biosorbentów w usuwaniu zanieczyszczeń różnego pochodzenia, m.in. pozostałości przemysłu metalurgicznego, jony metali toksycznych, leki oraz pestycydy. Szczególnie dużo miejsca Doktorant poświęcił omówieniu piśmiennictwa dotyczącego mikroorganizmów o wysokim potencjale biosorpcyjnym – cyjanobakteriom. Przygotowana w całości przez Autora część literaturowa dysertacji stanowi szerokie źródło informacji i jest dobrym wstępem do analizy otrzymanych wyników.

W rozdziale *Cel i zakres pracy* Doktorant sformułował główny cel rozprawy – ocenę zdolności wybranych gatunków cyjanobakterii do biosorpcji i/lub biotransformacji wybranych farmaceutyków, obecnych w medium hodowlanym oraz zbadanie wpływu tych związków na metabolizm sinic. W tej części rozprawy Autor przedstawił trzy tezy pracy oraz skrupulatnie określił plan eksperymentów badawczych zaplanowanych do weryfikacji przedstawionych wcześniej tez.

Rozdział *Metodologia pracy badawczej* zawiera szczegółowe opisy realizowanych badań wraz ze stosowanymi odczynnikami oraz aparaturą badawczą. Do eksperymentów Autor wybrał wspomniane już wcześniej cyjanobakterie (sinice):

słodkowodne *Anabaena* sp. oraz *Chroococidiopsis thermalis*, a także halofilną *Arthrospira platensis*, stosowane samodzielnie, bądź w konsorcjach (układach mieszanych), a testowanymi farmaceutykami były popularne leki o charakterze przeciwbólowym i przeciwzapalnym: paracetamol, diklofenak i ibuprofen. Do badania toksyczności wybranych układów płynów pochodowlanych wobec modelowych organizmów bezkręgowych i roślinnych użyto rozwielitki (*Daphnia magna*), która jest jednym z modelowych organizmów zwierzęcych wykorzystywanych w badaniach toksyczności oraz dwóch gatunków mikroalg: *Chlorella vulgaris* i *Haematococcus pluvialis*.

W najważniejszej części rozprawy pt. *Prezentacja i dyskusja wyników*, Kandydat skrupulatnie przedstawił i omówił otrzymane rezultaty, odnosząc się także do wyników już opublikowanych przez innych autorów i dostępnych w literaturze. W logiczny sposób wyjaśnił także przyjętą sekwencję postępowania w trakcie realizacji badań, wynikającą m.in. z dokonanej na wstępie optymalizacji metody analitycznej do oznaczania badanych leków w matrycy. Kolejne eksperymenty dotyczyły określenia wpływu farmaceutyków na wybrane gatunki cyjanobakterii z uwagi na skuteczność ich usuwania z medium hodowlanego oraz zdolność adsorpcji na powierzchni komórek mikroorganizmów. Otrzymane przez Autora wyniki są szczególnie istotne, ponieważ pokazują jak duże znaczenie mają testowane biosorbenty aktywne w usuwaniu zanieczyszczeń środowiskowych, takich jak często stosowane i szeroko dostępne leki przeciwbólowe i przeciwzapalne. Słodkowodne gatunki sinic najbardziej efektywnie usuwały paracetamol, który charakteryzuje się największym powinowactwem do wody, a wszystkie wykorzystane w badaniach gatunki cyjanobakterii były zdolne do skutecznej biosorpcji testowanych ksenobiotyków (paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu). Efektywność usuwania poszczególnych zanieczyszczeń zależy w dużej mierze od gatunku sinic oraz stężenia poszczególnych związków. Wykorzystanie aktywnych biosorbentów powoduje przekształcenie (biotransformację) ksenobiotyków w mniej toksyczne metabolity, a nie tylko adsorpcję samych zanieczyszczeń na powierzchni mikroorganizmów, co nie wymaga już późniejszego przetwarzania i oczyszczania płynów pochodowlanych.

W mojej opinii Doktorant dobrze zaplanował doświadczenia, wykorzystując szereg różnorodnych metod badawczych i technik pomiarowych. Dyskusja jest prowadzona w sposób rzeczowy i merytoryczny. Zaprezentowane w pracy wyniki są opracowane w staranny sposób.

Rozprawa napisana jest poprawnym językiem polskim, z uwzględnieniem słownictwa chemicznego, jednakże można w niej znaleźć drobne uchybienia natury językowej, edytorskiej, bądź niepoprawne sformułowania. Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie przytoczyć niektóre z nich, a także sformułować drobne uwagi, pytania i sugestie do Kandydata. Tym samym proszę o odniesienie się Autora podczas obrony do następujących aspektów:

- jak Autor definiuje pojęcie „ksenofarmaceutyki”, użyte w tytule pracy? Czy jest wg Doktoranta zasadnicza różnica pomiędzy terminami: „ksenobiotyki”, „ksenofarmaceutyki” i „lek”?
- poprawne nazewnictwo glonów powinno obejmować także nazwisko osoby, która pierwsza opublikowała informację o danym gatunku, np. *Chroococcidiopsis thermalis* Geitler 1933, albo synonim *Arthrospira platensis* Gomont 1892; wszelkie informacje dotyczące używania poprawnego nazewnictwa glonów można znaleźć w bazie AlgaeBase: <https://www.algaebase.org> Zapis danego taksonu glonów z autorem powinien pojawić się przy pierwszym jego podaniu w tekście lub konsekwentnie stosowany każdorazowo przy jego zapisie w całym tekście;
- na str. 35 Autor rozprawy podaje: „W niniejszej pracy zastosowano trzy gatunki sinic (...). Gatunki te zostały pozyskane z kolekcji Katedry Farmacji i Chemii Ekologicznej Uniwersytetu Opolskiego”. Natomiast z informacji zamieszczonych we wkładce, można wywnioskować, że wykorzystane glony pochodziły z CCALA - Kolekcji Kultur Organizmów Autotroficznych Instytutu Botaniki Czeskiej Akademii Nauk w Trzeboniu. Jakie więc jest „pochodzenie” sinic, używanych do eksperymentów w ramach rozprawy doktorskiej?
- Doktorant jest współautorem publikacji: J. Pogrzeba, A. Poliwoda, “Biosorption Ability of Pharmaceutically Active Compounds by *Anabaena sp.* and *Chroococcidiopsis thermalis*”, *Molecules* (2024), 29(18), 4488. Ta praca nie jest jednak zacytowana w ocenianej rozprawie, pomimo tego, iż zawarte są w niej te same dane eksperymentalne, takie jak na przykład:

Praca doktorska: mgr J. Pogrzeba str. 51, Rys. 15 Efektywność biosorpcji poszczególnych ksenofarmaceutyków z medium pochodowlanego po 21 dniach hodowli. Czerwoną linią (100%) wskazuje całkowite usunięcie leku (n=9; RSD < 10%)	Publikacja: <i>Molecules</i> (2024), 29(18), 4488 str. 7(17), Fig. 3 The biosorption efficiency of individual xenopharmaceuticals from the growth medium on the 21st day of cultivation. A red line indicates complete drug removal (100%). The error bars represent the standard error from at least nine replicates
--	--

str. 52, Rysunek 16 Efektywność adsorpcji poszczególnych testowanych substancji na powierzchni komórek cyjanobakterii. Linia falowaną rozgraniczono zmianę skali (n=9; RSD < 10%).	str. 8(17) Fig. 4. The amount of xenopharmaceutical bioadsorbed on the cell surface on the 21st day of cultivation, expressed as a percentage. A red line indicates complete drug removal (100%). The error bars represent the standard error from at least nine replicates
--	---

- str. 93 – 103 *Literatura:*

- przygotowany spis literatury nie jest jednolity, w niektórych pozycjach [np. poz. 9, 10, 22, 93, 99 itd.] nie wymieniono wszystkich autorów cytowanej publikacji;
- brak konsekwencji w przypisaniu numeracji DOI do każdej pozycji w tym spisie [np. poz. 29, 30, 33, 35, 38, 93, 171, 172, 173, 182, 219, 220, 222] z czego wynika taki zapis?;
- w poz. 30 – niekompletna dane publikacji – nie podano numeru zeszytu oraz numerów stron: Volume 41, May 2024, Pages 181-190;
- poz. [74, 78, 236] to najprawdopodobniej pozycje książkowe – nie podano jednak informacji o edytorze i wydawnictwie;
- podawane w tytułach publikacji nazewnictwo gatunków roślin powinno być zapisane kursywą [np. poz. 78];
- odnośniki literaturowe podane w formie stron www powinny mieć podaną datę dostępu do tejże strony [np. poz. 167, 168, 169].

Pomimo powyższych uwag bardzo pozytywnie oceniam przedstawioną do recenzji pracę doktorską, zawiera ona istotne informacje dotyczące nowych propozycji badawczych, które wcześniej nie zostały opisane w literaturze, a wspomniane uchybienia nie obniżają jakości prezentowanych wyników. Wykonany przez Doktoranta szeroki wachlarz badań doświadczalnych wymagał dobrego przygotowania teoretycznego i eksperymentalnego, dlatego w trakcie obrony proszę Pana mgr Jerzego Pogrzebę o informacje, które badania były wykonywane przez Niego osobiście, a w których tylko uczestniczył, a które były wykonane w ramach np. współpracy? Proszę także o odpowiedź, w jakiej formie Autor zamierza opublikować pozostałe wyniki swoich badań (publikacja, wnioski patentowe)?



Przechodząc do końcowej oceny recenzowanej pracy doktorskiej przygotowanej przez mgr. Jerzego Pogrzebę stwierdzam, że prowadzone w jej ramach badania stoją na odpowiednio wysokim poziomie, a praca zawiera wiele elementów nowości naukowej. Praca spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z artykułem 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*. Tym samym wnoszę do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego wniosek o dopuszczenie mgr. Jerzego Pogrzeby do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Bogusława Łęska

