

dr hab. Ksenia Pazdro, prof. nadzw. IO PAN
Instytut Oceanologii PAN
ul. Powstańców Warszawy 55
81-712 Sopot
pazdro@iopan.gda.pl

Sopot, 20 czerwca 2014

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Wagil
pt. „Zanieczyszczenie wód śródlądowych farmaceutykami weterynaryjnymi: analityka i
ocena ekotoksykologiczna”
wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Stepnowskiego**

Pozostałości leków przypisano do grupy „nowopojawiających się” zanieczyszczeń środowiska przyrodniczego, stanowiących bardzo istotne zagrożenie z uwagi na ich ciągłe wprowadzanie do środowiska oraz wysoką aktywność biologiczną. Badania naukowe wskazują, że pozostałości leków stosowanych przez społeczeństwo nie są w pełni eliminowane w procesach oczyszczania ścieków. Istotnym źródłem tych związków w środowisku są hodowle zwierząt (w tym ryb) oraz rolnictwo. W weterynarii farmaceutyki stosowane są nie tylko w celach terapeutycznych (m.in. jako leki antybakteryjne i środki przeciwpasożytnicze) ale również jako promotory wzrostu. Część zastosowanych leków jest wydalana z organizmu w postaci pierwotnej lub metabolizowanej, przenikając do środowiska bezpośrednio lub pośrednio (np. podczas nawożenia gleb za pomocą nawozów naturalnych). Pozostałości leków trafiają do środowiska wodnego, gdzie ulegają różnym, dotychczas niescharakteryzowanym ilościowo procesom, które wpływają na trwałość i rozprzestrzenianie się pozostałości tych związków w ekosystemie, jak również na ich toksyczność wobec organizmów żywych. Jednym z najistotniejszych skutków negatywnych obecności pozostałości farmaceutyków w środowisku jest zjawisko lekooporności. Zanieczyszczenia obecne w wodzie i osadach mogą również negatywnie wpływać na organizmy wodne z różnych poziomów troficznych ingerując tym samym w szereg procesów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania ekosystemu. Pomimo to, dostępne dane literaturowe wskazują, że los oraz konsekwencje ekologiczne obecności pozostałości leków w ekosystemach wodnych są wciąż rozpoznane w niewielkim stopniu. W szczególności dotyczy to obszaru naszego kraju, pomimo iż Polska należy do czołówki światowej pod względem stosowania środków farmaceutycznych.

W tym kontekście tematykę badań podjętą przez Doktorantkę uważam za niezwykle aktualną, istotną i w pełni uzasadnioną z poznawczego punktu widzenia.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Marty Wagil została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Piotra Stepnowskiego w Katedrze Analizy Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Praca składa się z wstępnego opracowania oraz cyklu publikacji. 32 stronicowe opracowanie w zwięzły sposób przedstawia cel i zakres prac jak również najistotniejsze uzyskane wyniki i wnioski wynikające z badań przedstawionych w załączonych publikacjach. Cykl publikacji, składających się na rozprawę to 4 artykuły opublikowane w czasopiśmie z bazy JCR – Chemosphere (IF=3,634). Ponadto 2 artykuły znajdują się w trakcie procesu wydawniczego i zostały umieszczone jako materiały uzupełniające.

Cel naukowy pracy został poprawnie i logicznie sprecyzowany. Zadania badawcze, których realizacji podjęła się pani mgr Wagil są obszerne i można wyróżnić wśród nich dwie grupy zagadnień. Pierwsza z nich to opracowanie miarodajnych procedur analizy wybranych pozostałości z grupy antybiotyków i leków przeciw pasożytniczych w próbkach środowiskowych o różnym składzie matrycy. Druga grupa dotyczy oceny ekotoksyczności oznaczanych związków wobec wybranych przedstawicieli organizmów wodnych z różnych poziomów troficznych.

Jakkolwiek w piśmiennictwie naukowym istnieje już szereg prac dotyczących oznaczania leków w próbkach środowiskowych to najczęściej dotyczą one wybranych grup związków i oznaczania ich w próbkach wodnych lub glebach. Dostępna literatura dotycząca miarodajnych oznaczeń pozostałości leków w innych, niż woda, składowych ekosystemów wodnych takich jak osady dennego, a szczególnie organizmy, jest wciąż nieliczna. Należy podkreślić, iż oznaczane anality występują w tego rodzaju próbkach w ilościach śladowych, procedury przygotowania próbek są wieloetapowe, co w połączeniu z występowaniem tzw. efektu matrycowego sprawia że wyniki końcowe mogą być obarczone dużym błędem. Opracowanie miarodajnych metod oznaczania stężeń pozostałości leków w próbkach środowiskowych charakteryzujących się odpowiednimi parametrami walidacyjnymi ma zatem kluczowe znaczenie w ocenie ryzyka środowiskowego obecności pozostałości farmaceutyków w środowisku. Wyniki odpowiednio dobranych testów ekotoksykologicznych w połączeniu z miarodajnymi pomiarami stężeń w środowisku stanowią podstawę do rzetelnego wnioskowania w zakresie oszacowania realnych szkodliwych skutków mogących wystąpić w środowisku, spowodowanych narażeniem na działanie substancji, w tym przypadku pozostałości leków weterynaryjnych.

Związki, które Doktorantka wybrała do badań to szeroko stosowane w weterynarii środki przeciwpasożytnicze z grupy benzimidazoli (flubendazol i fenbendazol) makrolitycznych laktonów (doramektyna) oraz antybiotyki z grupy nitroimidazoli (metronidazol) oraz fluorochinolonów (enrofloksacyna, cyprofloksacyna oraz norfloksacyna).

Szczegółowe cele wymienione przez Doktorantkę to:

- opracowanie i walidacja metod oznaczeń końcowych wybranych leków za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną jako metod pomocniczych służących do opracowania sposobu izolacji i wzbogacania leków z próbek środowiskowych
- opracowanie selektywnych i wydajnych metod izolacji i wzbogacania wybranych leków z próbek środowiskowych (wody, osadów oraz ryb)
- opracowanie i walidacja oznaczeń końcowych wybranych leków za pomocą techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) jako metod oznaczania tych związków w próbkach środowiskowych
- walidacja pełnych procedur analitycznych opracowanych poprzez połączenie optymalnych procedur izolacji i wzbogacania analitów z próbek środowiskowych z opracowanymi metodami oznaczeń końcowych przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS
- identyfikacja i oznaczenie ilościowe analitów w rzeczywistych próbkach środowiskowych
- ocena toksyczności oznaczonych analitów w stosunku do 4 grup organizmów: bakterii z gatunku *Vibrio fischeri*, glonów - zielenic z gatunku *Scenedesmus vacuolatus*, rośliny naczyniowej z gatunku *Lemna minor* oraz skorupiaków słodkowodnych z gatunku *Daphnia magna*

Prace eksperymentalne zostały przez Doktorantkę prawidłowo zaplanowane oraz wykonane w staranny sposób co pozwoliło na realizację wyżej wymienionych zadań. Uzyskane wyniki zostały omówione w sposób zwięzły i przejrzysty w ramach wstępnego opracowania jak i w sposób rzeczowy, merytorycznie poprawny i wyczerpujący w artykułach naukowych stanowiących rozprawę.

Z punktu widzenia elementu nowości naukowej za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki, przedstawione w rozprawie uważam:

- opracowanie metod oznaczeń końcowych za pomocą techniki HPLC-UV, które znalazły zastosowanie w późniejszych etapach dobrania odpowiednich warunków ekstrakcji i wzbogacania oznaczanych analitów w próbkach [D1, D2, D3]
- określenie efektów matrycowych dla poszczególnych analitów i próbek o różnym składzie matrycy [D1, D2, D3]

- opracowanie metod identyfikacji i oznaczania ilościowego wybranych pozostałości leków weterynaryjnych (w szczególności metronidazolu, flubendazolu, fenbendazolu i doramektyny) charakteryzujących się bardzo dobrymi wartościami parametrów walidacyjnych w próbkach wody rzecznej, osadów rzecznych i jeziornych oraz tkance mięśniowej ryb [D1,D2, D3]

-potwierdzenie przydatności opracowanych procedur w badaniach środowiskowych poprzez oznaczenie wyżej wymienionych pozostałości leków weterynaryjnych w próbkach rzeczywistych [D1,D2,D3]

- zidentyfikowanie po raz pierwszy pozostałości środków przeciwpasożytniczych (flubendazolu, fenbendazolu i doramektyny) oraz antybiotyku – metronidazolu w ekosystemie wodnym w rejonie pobrzeży południowobałtyckich [D1, D2, D3]

- ocena toksyczności wyżej wymienionych leków weterynaryjnych wobec organizmów wodnych z różnych poziomów troficznych, uwzględniająca wpływ właściwości badanych związków oraz wskazująca na znaczenie pomiarów frakcji biodostępnej przy wyznaczaniu wartości parametru EC_{50} [D4]

- wskazanie wysokiego ryzyka związanego z obecnością doramektyny w środowisku wód śródlądowych [D4]

W trakcie lektury rozprawy nasunęło mi się kilka uwag i komentarzy, które przedstawiam poniżej:

- Kryterium dobrania związków będących przedmiotem rozprawy, zgodnie z zaleceniami Komisji Europejskiej odnośnie Oceny Ryzyka Środowiskowego, była powszechność stosowania tych związków w weterynarii. Jakie inne grupy związków, szczególnie antybiotyków stosowanych w weterynarii, które także spełniają powyższe kryterium należałoby, zdaniem Doktorantki, uwzględnić w kolejnych badaniach?

- Analiza próbek ryb wykazała obecność oznaczanych analitów, w szczególności flubendazolu, fenbendazolu i doramektyny w ich tkance mięśniowej, często jednak te wartości zawierały się pomiędzy MDL i MQL. Uzyskane wyniki są cenne ze względu na potwierdzenie obecności tych związków w środowisku oraz z punktu widzenia konsumenta. Czy Doktorantka, biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe dotyczące akumulacji np. trwałych zanieczyszczeń organicznych w tkankach i narządach ryb mogłaby wytypować narządy (płyny ustrojowe, wydzieliny) które powinny być dodatkowo zbadane pod kątem stężeń pozostałości oznaczanych leków weterynaryjnych, aby w pełniejszy sposób oszacować biodostępność/bioakumulację/biotransformację tych zanieczyszczeń. Jeśli tak, to jakiego rodzaju trudności analitycznych można się spodziewać?

- W badaniach ekotoksykologicznych, zgodnie z zaleceniami Europejskiej Agencji Leków (dotyczących uzyskiwania danych o najwyższej wiarygodności) zastosowano

standaryzowane testy wykorzystujące organizmy wodne z różnych poziomów troficznych. W większości były to organizmy słodkowodne. W przypadku mikroorganizmów wybrano test zahamowania bioluminescencji bakterii morskich z gatunku *Vibrio fischeri*. Czy Doktorantka może wskazać standaryzowane testy stosujące mikroorganizmy bytujące w środowisku wód śródlądowych, które również mogłyby znaleźć zastosowanie w prowadzonych przez nią badaniach?

Doktorantka popełniła w tekście wprowadzającego opracowania niewiele błędów nomenklaturowych i stylistycznych. Z obowiązku recenzenta pozwalam sobie poniżej wskazać przykłady, natomiast pozostałe zostały zaznaczone w otrzymanym egzemplarzu rozprawy:

Stosowanie terminu:

- środowisko naturalne *zamiast* środowisko przyrodnicze
- różne matryce *zamiast* próbki o różnym składzie matrycy
- zastosowany w tabelach i rysunkach opis próbek biologicznych: tkanka *zamiast* tkanka mięśniowa ryb lub tkanka mięśniowa pstrąga
- niepełne podanie jednostek stężeń w przypadku osadów i tkanki mięśniowej ryb (ng g^{-1} *zamiast* ng g^{-1} s.m lub ng g^{-1} m.m) - ma to znaczenie w przypadku porównywania z danymi literaturowymi jak również w przypadku obliczania współczynników biokoncentracji/bioakumulacji)
- Rysunek 2 w opracowaniu – podpis pod rysunkiem: Procentowy udział poszczególnych leków w badanych matrycach *zamiast* - częstość występowania poszczególnych leków w próbkach
- Określono frakcję biodostępną w mediach biologicznych stosowanych w testach *zamiast* Określono frakcję biodostępną badanych związków w pożywce stosowanej w testach.
- organizmów na różnych poziomach troficznych *zamiast* organizmów z różnych poziomów troficznych
- glonów z rodzaju *Scenedesmus vacuolatus*, *zamiast* glonów z gatunku *Scenedesmus vacuolatus*

Podsumowanie

Wymienione wyżej nieliczne uwagi absolutnie nie obniżają wartości merytorycznej przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej. Koncepcja pracy jest prawidłowa a zastosowane metody zapewniły uzyskanie wyników adekwatnych do wyznaczonego celu. Doktorantka uzyskała nowatorskie wyniki, szczególnie w zakresie opracowania

miarodajnych metodyk analitycznych do określenia stężenia wybranych pozostałości farmaceutyków weterynaryjnych w różnych komponentach ekosystemu wód śródlądowych. Na podkreślenie zasługuje wnikliwa i częstokroć krytyczna analiza uzyskanych wyników, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Badania zostały zaprezentowane w renomowanym czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania. Według przedstawionych mi dokumentów, całkowity dorobek pani magister Wagil obejmuje współautorstwo 10 prac oryginalnych w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, 4 prac w materiałach konferencyjnych oraz 26 doniesień na konferencjach krajowych i zagranicznych. Dwa kolejne artykuły znajdują się w trakcie procesu wydawniczego. W przypadku czterech artykułów, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, pani mgr Wagil jest ich pierwszym ich autorem. Fakt ten, potwierdzony załączonymi oświadczeniami świadczy o wiodącej roli Doktorantki w ocenianych przez mnie badaniach. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki oceniam również jako istotny krok w kierunku poznania źródeł i losu środowiskowego pozostałości farmaceutyków w ekosystemach wodnych zarówno śródlądowych jak i wód przybrzeżnych Bałtyku i wytyczenia dalszych kierunków badań w tym zakresie. Tym samym przyczyni się to do miarodajnej oceny skutków obecności tych związków w środowisku przyrodniczym i prawdopodobieństwa wystąpienia odległych efektów toksycznych.

Reasumując, po zapoznaniu się z całością pracy uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pani mgr Marty Wagil w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim i określone w ustawie o stopniach i tytule naukowym (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r o stopniach i tytule naukowym z późn. zm.). Wnioskuje zatem o dopuszczenie Pani mgr Marty Wagil do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ksenia Pazdro

