

prof. dr hab. Rafał Głowacki
Katedra Chemii Środowiska
90-236 Łódź, ul. Pomorska 163
rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Klaudii Stando pt:

Opracowanie i zastosowanie nowych procedur analitycznych do oznaczania wybranych zanieczyszczeń oraz produktów ich transformacji w środowisku,
wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Sylwii Bajkacz, prof. PŚ

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Klaudii Stando została wykonana w Katedrze Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. Głównym celem badań podjętych przez Doktorantkę było opracowanie nowych metod analitycznych, umożliwiających oznaczanie wybranych środków bakteriobójczych (AMs) oraz produktów ich przemian (TPs) w próbkach środowiskowych. W badaniach Pani Klaudia Stando stosowała technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS), wykorzystując opracowane z jej udziałem metody w tzw. analizach przesiewowych i niecelowanych.

Problem pozostałości w środowisku farmaceutyków, w tym antybiotyków i syntetycznych środków bakteriobójczych oraz produktów ich przemian, jest niezwykle istotny w dobie coraz to większego ich spożycia, zarówno przez ludzi jak i zwierzęta. W przypadku ludzi chodzi głównie o efekt terapeutyczny podczas gdy u zwierząt dochodzi aspekt poprawy wydajności produkcji. Przyczyn takiego stanu rzeczy jest wiele i tyle samo prób rozwiązania tego palącego problemu. Jednym z nich jest objęcie nadzorem przez WHO spożycia wspomnianych środków. Od roku 2003 w UE obowiązują natomiast regulacje, które mają za zadanie ograniczyć stosowanie AMs w hodowli bydła, trzody chlewnej i drobiu, ale także ryb. Drogi emisji AMs i TPs do środowiska są różnorakie, nie zawsze oczywiste. Chodzi przede wszystkim o nawożenie gleby obornikiem, ale również jej wzbogacanie kompostem zawierającym pióra, resztki pasz i odpady biologiczne, np. z ubojni. Znaczący udział w tym „procederze” mają również oczyszczalnie ścieków.

Katedra Chemii Środowiska
Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego
ul. Pomorska 163, 90-236 Łódź, tel/fax (+48) (42) 635-58-32,
<http://www.chemia.uni.lodz.pl/kchs>,
tel. (+48) (42) 635-58-35, e-mail: rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Klaudii Stando stanowi zbiór dziewięciu spójnych tematycznie artykułów, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach branżowych, takich jak: Chemosphere (2021, IF 8,943; 140 pkt, **P1**), Science of the Total Environment (2022, IF 10,753; 200 pkt, **P2**), Molecules – 2 pozycje (2021, 2022, IF 4,927; 140 pkt, **P3 i P5**), Scientific Reports (2022, 4,996; IF 140 pkt, **P4**), International Journal of Environmental Research and Public Health (2022, IF 4,614; 140 pkt, **P6**), Environmental Sciences & Pollution Research (2023, IF 5,800; 100 pkt, **P7**), International Journal of Phytoremediation (2023, IF 3,7; 100 pkt, **P8**), Journal of Photochemistry, Photobiology, A: Chemistry (2024, IF 4,3; 70 pkt, **P9**). Całkowity dorobek naukowy Doktorantki obejmuje 16 współautorskich publikacji, współautorstwo 2 rozdziałów w monografii oraz 21 wystąpień konferencyjnych ustnych (4) i posterowych (17). Jest to dorobek imponujący jak na ten etap kariery zawodowej, szczególnie jeśli uwzględni się, że został zgromadzony w latach 2020-2024.

W obszernym opisie, tzw. przewodniku, który jest uzupełnieniem załączonych publikacji, Pani mgr inż. Klaudia Stando zarysowała kontekst badawczy, uzasadniła podjęcie tematu badań, jasno sformułowała cel, dokonała przeglądu literatury przedmiotu i w sposób usystematyzowany przedstawiła wyniki swoich badań. Całość zwieńczają podsumowanie, wnioski i bibliografia (171 pozycji), która została dobrana w sposób niebudzący zastrzeżeń.

W swojej pracy Doktorantka podjęła próbę opracowania metod oznaczania wybranych AMs, łącznie 22, spośród 7 grup leków, tj. sulfonamidów (SAs), tetracyklin (TCs), fluorchinolonów (FQs), makrolidów (MQs), betalaktamów (β -Ls), linkozyamidów (LAs) i glikopeptydów w wodach, ściekach, glebie i tkankach roślinnych. Ich dobór został przeprowadzony w oparciu o raport WHO dotyczący spożycia antybiotyków w latach 2016-2018, opublikowane wyniki badań przesiewowych środowiska oraz dane na temat spożycia leków na terenie Polski. Także wybór HPLC-MS/MS nie był przypadkowy, jako że stanowi ona technikę pierwszego wyboru podczas oznaczania AMs w próbkach środowiskowych, co Doktorantka wykazała również w autoreferacie. Takie podejście miało swoje konsekwencje w postaci wyboru klasycznych technik na etapie przygotowania próbki do analizy chromatograficznej. Mowa o technikach ekstrakcyjnych, w tym ekstrakcji do fazy stałej (SPE) i ekstrakcji ciało stałe - ciecz (SLE).

Autorka rozprawy wykonała szereg eksperymentów, których celem było dobranie odpowiednich warunków ekstrakcji dla dwóch rodzajów próbek środowiskowych, tj. próbek ciekłych (woda, ścieki; **P1, P2, P6, P8**) i stałych (gleba, tkanki roślinne, **P4, P7, P5, P8**). Badano odzysk analitów, takich jak: ciprofloksacyna (CIP), kindamycyna (CLD), klarytromycyna

(CLR), doksycyklina (DOX), enrofloksacyna (ENF), lewofloksacyna (LVF), metronidazol (MET), oksytetracyklina (OTC), sulfadiazyna (SFD), sulfametizol (SFH), sulfametazyna (SFM), sulfapirydyna (SFP), sulfamerazyna (SFR), sulfatiazol (SFT), sulfizoksazol (SFX), sulfametoksazol (SMX), tetracyklina (TC), trimetoprim (TRI), tylozyna (TYL) i wankomycyna (VAN). W przypadku badań dotyczących bioakumulacji i biotransformacji AMs pobranych przez rośliny z wody i gleby (**P5, P6, P8**) analizowano pietruszkę zwyczajną, limnobium rozłogowe, rzodkiew japońską i rzesę wodną. Proces optymalizacji był standardowy i obejmował dobór sorbentu i jego masy, pH próbki, rodzaj i objętość eluentów, rodzaj rozpuszczalnika, w którym rozpuszczano pozostałość po odparowaniu ekstraktu oraz rodzaj filtra strzykawkowego. Ważnym osiągnięciem w tym obszarze, w kontekście przeprowadzonych w ramach dysertacji eksperymentów, było wykazanie przez Doktorantkę, że problemy z odtwarzalnością procedur ekstrakcji AMs z gleby są związane z nieuwzględnieniem zawartości materii organicznej, składników mineralnych i tekstury. Ta część badań nie budzi żadnych wątpliwości zarówno od strony merytorycznej, co potwierdzili recenzenci publikacji będących podstawą dysertacji, ale również od strony prezentacji wyników w autoreferacie Doktorantki.

Drugim ważnym elementem przeprowadzonych badań była optymalizacja parametrów pracy detektora mas dla potrzeb opracowanych metod chromatograficznych. W przypadku wód, ścieków, gleb oraz tkanek roślinnych były to dwie metody, które umożliwiały oznaczanie wybranych 22 AMs. Dwie kolejne dotyczyły oznaczania pojedynczych zanieczyszczeń. Podobnie jak w przypadku etapu przygotowania próbki do analizy zastosowano klasyczne podejście, polegające na wykorzystaniu pracy detektora w trybie monitorowania reakcji następczych (MRM). Określono przejścia jon pseudomolekularny – jon potomny oraz odpowiadający im potencjał rozgrupowania klastrów (DP), a także energię kolizji i potencjał wyjścia z komory zderzeń (CXP). Dokonano także doboru warunków rozdzielania chromatograficznego, w tym rodzaju kolumny chromatograficznej, składu i prędkości przepływu fazy ruchomej, rodzaju elucji, temperatury oraz objętości wprowadzanej próbki. Opracowane metody zostały zwalidowane z uwzględnieniem zasad obowiązujących w przypadku analizy próbek środowiskowych i biologicznych. Wszystkie działania podjęte w tym obszarze zostały przeprowadzone poprawnie i nie budzą zastrzeżeń.

Wykorzystując opracowane narzędzia analityczne (**P1-P9**) Autorka oceniła efektywność usuwania 14 wybranych AMs w procesie oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego. Wskazała okresy największej oraz najmniejszej emisji AMs do oczyszczalni ścieków. Potwierdziła, że stosowane metody oczyszczania ścieków nie zapewniają usunięcia AMs a mogą

stanowić przyczynę generowania ich trwałych pochodnych (TPs). Opracowane procedury umożliwiły również śledzenie losów AMs w glebie, szlaki ich przemieszczania a tym samym dostępność dla roślin (P4, P5). Przeprowadzone badania umożliwiły wyciągnięcie dość oczywistych wniosków, mówiących mianowicie, że: zawartość węgla organicznego ma istotne znaczenie jeśli chodzi o mobilność AMs, systematyczne wprowadzanie AMs do środowiska skutkuje jego ciągłą obecnością, niektóre rośliny posiadają potencjał aby usuwać AMs ze środowiska (fitoremediacja (P6, P8). W ramach badań laboratoryjnych Doktorantka dokonała oceny skuteczności fotokatalizy heterogenicznej w kontekście usuwania wybranych AMs (P3, P9). Wykorzystując różne tryby pracy detektora mas Pani Klaudia Stando podjęła próbę prześledzenia szlaków transformacji AMs w środowisku, wskazując na możliwe produkty tych przemian.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi, w mojej opinii spójną całość i od strony merytorycznej nie budzi żadnych wątpliwości, zarówno co do jakości jak i wartości naukowej. Zaplanowanie, przeprowadzenie eksperymentów, zastosowane narzędzia badawcze oraz wyciągnięte logiczne wnioski świadczą o doskonałym teoretycznym i praktycznym przygotowaniu Doktorantki do badań naukowych. Wskazują jednoznacznie na dużą samodzielność ale również umiejętność prowadzenia współpracy naukowej.

Za szczególnie wartościowe uważam osiągnięcia Pani mgr inż. Klaudii Stando wymienione poniżej.

1. Opracowanie efektywnych narzędzi analitycznych, w tym optymalizacja przygotowania próbki i walidacja, bazujących na technice HPLC-MS/MS, które z powodzeniem zostały wykorzystane praktycznie w analizie próbek biologicznych, w tym wód, ścieków, gleby oraz tkanek roślinnych na okoliczność oznaczania AMs.
2. Wykazanie/potwierdzenie, że oczyszczalnie ścieków oraz nawożenie gleby obornikiem uzyskanym od zwierząt przyjmujących środki farmakologiczne stanowią główne źródła AMs i produktów ich przemian w środowisku.
3. Potwierdzenie, że fitoremediacja oraz kataliza heterogeniczna mogą być przydatne w kontekście eliminowania pozostałości AMs oraz TPs ze środowiska.
4. Podjęcie próby identyfikacji produktów przemian AMs w środowisku poprzez wykorzystanie analiz przesiewowych i niecelowanych w oparciu o technikę HPLC-MS/MS oraz wykazanie, że są one odporne na biologiczne metody oczyszczania ścieków.

Oprócz bardzo wielu niepodważalnych walorów, przewodnik po cyklu publikacji posiada pewne drobne niedociągnięcia. Chodzi np. o niepoprawne użycie określenia „nastrzyk” (str. 54) w kontekście wprowadzania próbki do kolumny chromatograficznej, traktowanie jako synonimów określeń „ilość” i „liczba” czy bardzo nieliczne błędy literowe (np. ulfametazyna; str. 46, Tabela 11) i interpunkcyjne. W odniesieniu do całości tego kompleksowego opracowania są one w gruncie rzeczy do pominięcia.

Chciałbym jednak aby Autorka rozprawy odniosła się do dwóch istotnych kwestii.

1. Jaki wpływ na wiarygodność uzyskanych wyników, w kontekście przeprowadzonych badań oraz specyfiki stosowanej techniki analitycznej, wywierał tzw. efekt matrycowy?
2. W przypadku analiz niecelowanych (NTA), prowadzonych w oparciu o niskorozdzielczą technikę HPLC-MS/MS, dużą trudnością jest ustalenie struktur cząsteczkowych związków. Jak Pani poradziła sobie z tym problemem?

Po przeanalizowaniu materiałów stanowiących podstawę w procedurze ubiegania się o stopień doktora przez Panią mgr inż. Klaudię Stando stwierdzam, że założony cel pracy został osiągnięty a rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Stwierdzam również, że przedstawiona mi do recenzji praca zatytułowana ***Opracowanie i zastosowanie nowych procedur analitycznych do oznaczania wybranych zanieczyszczeń oraz produktów ich transformacji w środowisku*** spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. Nr 2018, poz. 1668, z późn. zm. W konsekwencji wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr inż. Klaudii Stando do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam ponadto, że zbiór publikacji stanowiący podstawę dysertacji, po uwzględnieniu oświadczeń współautorów oraz Doktorantki, mógłby z powodzeniem być prezentowany jako cykl habilitacyjny. Dlatego też, biorąc pod uwagę jakość przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej badań, ich nowatorstwo, wartość merytoryczną oraz zakres, a także fakt, że zostały w całości opublikowane, z niekwestionowanym bardzo istotnym udziałem Doktorantki, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o jej wyróżnienie.



Katedra Chemii Środowiska
Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego
ul. Pomorska 163, 90-236 Łódź, tel/fax (+48) (42) 635-58-32,
<http://www.chemia.uni.lodz.pl/kchs>,
tel. (+48) (42) 635-58-35, e-mail: rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl