

Prof. dr hab. Barbara Pawlik-Skowrońska
Katedra Hydrobiologii i Ochrony Ekosystemów
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Dobrzańskiego 37
20-262 Lublin

Lublin, 4.07.2018 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Romany Piaseckiej
p.t. „Wykorzystanie melasy w hodowli wybranych gatunków zielenic (Chlorophyta)”**

**wykonanej w Instytucie Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii
Nauk w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Tysa oraz promotora
pomocniczego dr Izabeli Krzemińskiej.**

Recenzję wykonano w związku z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie; pismo Dyrektora Instytutu prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego z dnia 10.05.2018 r.

Tematyka rozprawy

W ostatnich latach wzrosło niezmiernie zainteresowanie glonami – grupą prokariotycznych i eukariotycznych organizmów (zróżnicowaną pod względem morfologicznym, fizjologicznym i ekologicznym), zdolnych do syntezy różnorodnych związków budulcowych oraz licznych metabolitów wtórnych o bardziej lub mniej poznanej aktywności biologicznej. Szybko rozmnażające się w odpowiednich warunkach mikroskopijne glony stały się poszukiwanym źródłem związków, posiadających potencjalne walory, które dają szansę zastosowania ich w medycynie lub gospodarce. Do celów aplikacyjnych niezbędna jest jednak znaczna biomasa tych organizmów, której uzyskanie zależy od przyrodzonych właściwości samych komórek (np. sposobu odżywiania się i reprodukcji) oraz warunków ich hodowli, które w pewnym zakresie można modyfikować.

W tym kontekście, problematyka podjęta przez doktorantkę, a dotycząca poszukiwania najlepszych sposobów pozyskiwania biomasy kokalnych zielenic z wykorzystaniem odpadowych źródeł węgla i azotu jest aktualna oraz istotna ze względu na zróżnicowanie licznych gatunków Chlorophyta w zakresie ich wymagań pokarmowych oraz warunków wzrostu.

Struktura rozprawy, walory i uwagi krytyczne

Przedstawiona do oceny praca obejmuje 126 stron maszynopisu, na który składają się : polsko- i angielskojęzyczny abstrakt, wstęp z określonym celem rozprawy, wykaz zastosowanych skrótów, liczący 26 stron przegląd literatury, rozdział metodyczny, wyniki, dyskusja, wnioski oraz bibliografia.

Obszerny przegląd literatury przedstawiający charakterystykę biochemiczną zielenic, strategię odżywiania się, procesy prowadzące do syntezy określonych związków budulcowych i metabolitów oraz omówienie dotychczasowego stanu wiedzy w zakresie potencjału biotechnologicznego glonów w połączeniu z wykorzystaniem materiałów odpadowych z przemysłu rolniczego, został podzielony na kilka podrozdziałów co znacznie przyczyniło się do jego percepcji. Dobrym pomysłem było tabelaryczne przedstawienie znanych dotąd przykładów zastosowania różnych ubocznych lub odpadowych produktów przemysłu rolniczego do hodowli glonów z rodzajów *Scenedemus* i *Parachlorella*. W przejrzystym przygotowanym przeglądzie literatury autorka nie ustrzegła się jednak pewnych niedociągnięć. I tak: na str. 15 błędnie wskazano nazwy dwóch rodzin glonów Charophytacea i Chloropytaceae. Należało również wskazać, że jednokomórkowe zieleniec rozmnażają się głównie przez podział komórek a nie przez fragmentację. Na str. 23 przeoczono fakt, że produktem jasnej fazy procesu fotosyntezy jest również produkcja tlenu. Nieprecyzyjnie zacytowano również parametry wzrostu (tylko po 3 wartości) glonów należących aż do 7 różnych grup taksonomicznych (str. 23).

W drugim rozdziale rozprawy Doktorantka **wyraźnie wskazała co było jej zamierzeniem badawczym oraz jasno sformułowała hipotezę badawczą**, że melasa buraczana będąca źródłem biogenów, głównie węgla i azotu wpływa na kinetykę wzrostu jednokomórkowych glonów *Parachlorella kessleri* i *Tetradismus obliquus* oraz determinuje skład biochemiczny biomasy glonowej, a szczególności lipidów, węglowodanów, białek oraz profil kwasów tłuszczowych.

W rozdziale **Material i Metody** omówiono sposób prowadzenia hodowli dwóch gatunków mikroskopijnych zielenic w warunkach laboratoryjnych i oceny ich wzrostu oraz przedstawiono **szereg klasycznych metod (mikrobiologicznych, chemicznych) oraz nowoczesnych technik (chromatografia gazowa, spektroskopia w podczerwieni FT-IR) adekwatnych do zamierzonego celu**. Jednakże w rozdziale tym można zauważyć pewne nieścisłości - szczególnie dotyczące systematyki i taksonomii jednego z obiektów badań oraz niekompletność opisu ważnych elementów zastosowanej metodyki. I tak: zaistniał chaos nomenklaturowy dotyczący gatunku zaklasyfikowanego przez autorkę jako *Tetradismus*

obliquus. W pracy wskazano, że obiektem badań była zielenica – szczep 276-1 pozyskany w kolekcji kultur glonowych SAG w Getyndze oznaczony pierwotnie jako *Scenedesmus obliquus* i pod tą nazwą zilustrowany w pracy (Ryc.3), który następnie w wyniku badań molekularnych został w latach dwutysięcznych zaliczony do rodzaju *Acutodesmus* i figuruje w metryczce kolekcji jako *Acutodesmus obliquus*. Co skłoniło Doktorantkę do nadania nazwy *Tetradesmus* szczepowi zielenicy, którą pozyskała z kolekcji SAG? Na stronie 43 błędnie podano również nazwę rodzajową tego glonu oraz opis morfologii, nie odnoszący się do *T. obliquus*. Klasyfikacja taksonomiczna jednokomórkowych lub tworzących cenobia gatunków i szczepów zielenic jest dość trudna i wymaga szerokich badań molekularnych, co jest w ostatnich latach czynione (Krienitz i Bock, 2012). Należało więc podać w pracy nazwę gatunkową wymienioną przez kolekcję, z której dany szczep glonu pochodzi.

Zbyt zdawkowo opisano sposób prowadzenia hodowli inokulacyjnych i stacjonarnych (ustęp 3.1.33). Informacja, że prowadzono hodowle w fotobioreaktorach jest zbyt ogólnikowa. Należało podać wartości pH użytych podłoży płynnych, gdyż od nich zależy forma węgla nieorganicznego i jego dostępności dla komórek glonów. Nie podano również jakie były objętości prowadzonych hodowli stacjonarnych oraz objętości bioreaktorów, a to decyduje o dostępie powietrza zawierającego CO₂ – niezbędnego do rozwoju hodowli. Odnosi się wrażenie, że hodowle kontrolne w eksperymentach prowadzone były w ogóle bez dostępu powietrza lub z bardzo niewielkim. Czy w trakcie eksperymentów hodowle były mieszane, co ma z kolei znaczenie dla dostępności istotnych dla wzrostu glonów czynników takich jak światło fotosyntetycznie czynne. Ponadto, początkowe wartości gęstości optycznej hodowli stacjonarnych OD₆₅₀ = 0.5 nie odpowiadają stężeniu biomasy podanej przez autorkę w rozdziale 3.2.1. Biomasa ta winna być oszacowana z większą dokładnością na podstawie krzywych kalibracyjnych wyznaczonych dla poszczególnych gatunków. Recenzent wyraża nadzieję, że niedociągnięcia te i niejasności zostaną usunięte w procesie przygotowywania wyników badań do publikacji.

Wyniki badań opracowano i przedstawiono na ogół prawidłowo na 16 rycinach i w 6 tabelach, co wraz z ich opisem obejmuje 32 strony maszynopisu. Przebieg rozwoju hodowli glonów wyrażono za pomocą oceny przyrostu suchej masy komórek, a także specyficznego tempa wzrostu. Jednakże, nie jest jasne jak otrzymano wyniki dotyczące specyficznego tempa wzrostu hodowli w okresie 6 dni (Ryc. 8 i 10), gdyż w rozdziale metodycznym podano, że wyznaczano je tylko dla początkowej 3 – dniowej fazy rozwoju hodowli. W tabelach 3 i 4 porównujących wyniki dotyczące parametrów wzrostu hodowli i produktywności dwóch

gatunków glonów należało wyraźnie podać, że oznaczenia literowe wskazujące istotne różnice nie odnoszą się do wierszy lub kolumn w tabeli, ale do poszczególnych gatunków. W przypadku rycin przedstawiających procentową zawartość białek, węglowodanów, tłuszczów oraz poszczególnych kwasów tłuszczowych, należy podać co przyjęto za wartość 100 %.

Przechodząc do oceny merytorycznej wartości uzyskanych wyników należy podkreślić bardzo interesujące dane wskazujące na pozytywny wpływ dodatku melasy buraczanej do podłoża hodowlanego na wzrost obu badanych zielenic oraz na zróżnicowaną syntezę związków budulcowych i produktywność biomasy. Za szczególne cenne uważam wyniki dotyczące produkcji poszczególnych, długo-łańcuchowych kwasów tłuszczowych C16-C18 o różnym stopniu nasycenia oraz wpływu melasy na wzrost produkcji w komórkach wielonienasyconych kwasów przy bardzo niskim dostępie CO₂. Prezentacja na tej samej rycinie wyników badań zawartości tych samych kwasów w 2 gatunkach glonów ułatwiłoby znacznie ich percepcję i porównanie. Ponadto, w przypadku Rycin 13-18 (przedstawiających % zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych) podać co uznano za 100 %. Natomiast w tytułach tabel 5 i 6 – jednostkę , w której wyrażono dane . Przyżyciowe porównanie jakości biomas glonów pod względem zawartości węglowodanów , lipidów i białek przy użyciu spektroskopii w podczerwieni wskazuje, że kontrolne komórki badanych glonów różniły się pod tym względem bardzo znacznie . Zaskakujący jest znaczny spadek zawartości węglowodanów u *Parachlorella kessleri* pod wpływem suplementacji zarówno CO₂ jak i melasą . Z czego wynika tak znaczne zróżnicowanie w zawartości węglowodanów w poszczególnych hodowlach kontrolnych badanych zielenic? Wymienione niedociągnięcia i niejasności powinny zostać zweryfikowane. Na podkreślenie wartości przedstawionych w rozprawie wyników wskazuje fakt , że częściowo zostały już opublikowane w wysoko punktowanym czasopiśmie z listy JCR.

Rozdział **Dyskusja** wraz z wnioskami liczy 17 stron i został podzielony na 5 podrozdziałów, w których można miejscami dostrzec pewną zbędną rekapitulację opisu wyników lub uzasadnienia dotyczącego wyboru wariantów eksperymentów. Uzyskane wyniki zostały porównane z danymi literaturowymi odnoszącymi się do innych gatunków mikroskopijnych Chlorophyta hodowanych na podłożach z dodatkiem innych niż melasa buraczana, organicznych źródeł węgla . Wykorzystując aktualne doniesienia literaturowe, obszernie przedyskutowano wyniki w zakresie procesów fizjologicznych i potencjału biotechnologicznego badanych gatunków glonów, jednakże we rozdziale Wnioski zabrakło wyraźnego porównania ich głównych walorów aplikacyjnych. Zamiast tego zostały one

„przemyczone” w rozdziale Dyskusja. Oprócz posiadanego potencjału biotechnologicznego wykorzystywanie biomasy glonów do celów technologicznych napotyka na szereg ograniczeń, których istnienie należałoby zasygnalizować i przedstawić.

Bibliografia, którą zamieszczono w rozprawie jest bardzo bogata i zawiera aż 201 pozycji literatury, z których większość to prace z ostatnich 10 lat (144), co świadczy o dobrym, wszechstronnym rozeznaniu doktorantki w przedmiocie jej badań oraz aktualnym stanie jej wiedzy w tym zakresie. Są to poważne prace naukowe, w większości oryginalne, opublikowane w międzynarodowych czasopismach.

Posumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest dziełem poprawnym z formalnego punktu widzenia, napisanym poprawną polszczyzną i charakteryzującym się wysoką wartością merytoryczną. Wyniki badań eksperymentalnych stanowią ważny, oryginalny wkład do wiedzy na temat fizjologii i produktywności zieleni o zdolnościach mikrotróficznych, w kontekście ich wartości aplikacyjnej, które to zagadnienie budzi zainteresowanie wielu ośrodków naukowych na świecie. Doktorantka osiągnęła cel, który przed sobą postawiła stosując właściwie dobrane metody badawcze. Obowiązkiem recenzenta jest dostrzec nie tylko mocne ale i słabe strony ocenianej pracy, lecz nieliczne usterki wymienione w odpowiednich akapitach recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy. Zdaniem recenzenta, praca posiadająca aspekt zarówno naukowy jak i aplikacyjny stanowi bazę do przygotowania wartościowych publikacji w wysoko punktowanych czasopismach.

W związku z powyższym stwierdzam, że praca doktorska pani mgr Agaty Romany Piaseckiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim (Ustawa z dn. 14 marca 2003 r.) i wnoszę o dopuszczenie mgr Agaty R. Piaseckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

