

Prof. dr hab. Konrad Wołowski
Profesor Instytutu Botaniki im. W. Szafera
Polskiej Akademii Nauk,
31 512 Kraków, Lubicz 46

Kraków, 14. 02. 2024 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Wiolety Ciempiel

1. Podstawa prawna recenzji

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, z dnia 14 grudnia. 2023 roku. Przygotowano ją zgodnie z umową zawartą w dniu 18. 12. 2023 roku na podstawie tekstu w przesłanym egzemplarzu pracy.

Pani mgr Wioleta Ciempiel (Babiak) jest absolwentką Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w zakresie studiów licencjackich (w latach 2012-2015) i magisterskich (w latach 2015-2017). Tytuł zawodowy magistra otrzymała na podstawie rozprawy „Wpływ metali ciężkich na aktywność oksydazy kwasu szczawiowego w grzybni *Abortiporus biennis*” co potwierdza jej zainteresowanie badaniami biologicznymi i biochemią mikroorganizmów

Rozprawa doktorska mgr Wiolety Ciempiel pt. „Określenie warunków syntezy, składu chemicznego i właściwości zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS) wytwarzanych przez wybrane jednokomórkowe glony” została wykonana pod kierunkiem dr hab. Izabeli Krzemińskiej, Adiunkta Instytutu Agrofizyki PAN z udziałem promotora pomocniczego dr Magdaleny Czemińskiej w ramach Studiów Doktoranckich.

2. Ogólna charakterystyka recenzowanej pracy

Przedstawiona rozprawa doktorska jest manuskryptem, do którego włączono spójne tematycznie dwa opublikowane artykuły naukowe stanowiące swoistego rodzaju rozdziały całości rozprawy:

1. Babiak,W; Krzeminska, I. 2021. Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A Review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes. *Energies* 14, 4007. <https://doi.org/10.3390/en14134007>

2. Ciempiel,W.; Czemińska, M.; Szymanska-Chargot, M.; Zdunek,A.; Wiecek, D.; Jarosz-Wilkofazka, A.;Krzeminska, I. 2022. Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities. *Molecules* 27, 7153. <https://doi.org/10.3390/molecules27217153>

Wymienione wyżej prace opublikowane zostały w cenionych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, ukazały się w okresie minionych 2 lat. Kandydatka jest pierwszą autorką w obydwu publikacjach. Jej wkład w powstanie wyżej wymienionych opracowań był znaczący, bowiem obejmował zarówno współdziałanie w opracowaniu koncepcji i problematyki manuskryptów, które powstały w oparciu o wyniki różnego typu analiz i badań laboratoryjnych prowadzonych przez Kandydatkę w ramach pracy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, jest manuskrytem liczącym 137 stron, w skład którego wchodzi: strona tytułowa, streszczenie polsko i angielskojęzyczne, szczegółowy spis treści oraz lista publikacji włączonych do rozprawy. Dalsza część stanowi wprowadzenie, które jest ważnym elementem rozprawy czyli opublikowanym w 2021 roku artykułem przeglądowym będącym swoistego rodzaju kompendium wiedzy o zewnątrzkomórkowych polimerach syntetyzowanych przez mikroorganizmy w tym cyjanobakterie i glony. Rozdział ten Kandydatka dopełnia szczegółowymi informacjami o właściwościach polimerów EPS oraz możliwościami wykorzystania ich w rolnictwie. Szeroko omówiona problematyka badawcza jest formą uzasadnienia podjętych badań w ramach doktoratu. W rozdziale (2) zostały określone poprawnie cele, zadania i hipotezy badawcze. W następnym rozdziale *materiał i metody* (3), Kandydatka podała charakterystykę wykorzystanych taksonów glonów i procedury ich hodowli oraz szczegółowy opis metod badawczych. Zasadniczą część pracy stanowi rozdział (4), w którym zamieściła wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych z powodzeniem eksperymentów badawczych opisanych w manuskrypcie i opublikowanej pracy (Ciempiel i inni. 2022, P2.) oraz manuskrypcie złożonym do druku (P3). Kolejny obszerny rozdział (5) stanowi autorska dyskusja, bardzo dobrze przeprowadzona nad otrzymanymi wynikami. Kandydatka syntetycznie przedstawiła wnioski w rozdziale (6) i bibliografię, liczącą 155 pozycji (w rozdziale 7). Do całości, jak wspominałem, załączono teksty dwóch bardzo wartościowych artykułów (Ciempiel i inni. 2021, 2022), stanowiących integralne części rozprawy (8). Na końcu znajdują się oświadczenia współautorów, całość maszynopisu zwieńcza życiorys naukowy Kandydatki (rozdział 10).

3. Szczegółowa charakterystyka poszczególnych części

Z wyżej przedstawionej charakterystyki układu pracy widać wyraźnie, że w strukturze maszynopisu znalazły się wszystkie potrzebne rozdziały, logicznie powiązane ze sobą, stanowiące zwartą całość. Wprowadzenie do tematyki badań stanowi bardzo dobrze przygotowany i opublikowany artykuł (P1. Babiak (Ciempiel) & Krzemińska 2021). Zawiera on wieloaspektową analizę literatury poprowadzoną pod kątem wpływu różnorodnych czynników na wytwarzanie, skład i właściwości chemiczne oraz procesy flokulacyjne i znaczenie aplikacyjne polimerów zewnątrzkomórkowych EPS, wytwarzanych przez mikroorganizmy. Niewątpliwie zapoznanie się Kandydatki z tak obszerną literaturą, poświadcza Jej solidne przygotowanie do samodzielnej pracy naukowej.

Na bazie poznanej literatury oraz badań własnych Kandydatka umiejętnie uzasadniła potrzebę zajęcia się problemem badawczym podkreślając, że polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) są nośnikami oprócz różnorodnych polisacharydów również białek, lipidów, kwasów organicznych i nukleinowych. Przedstawiła też szczegółową charakterystykę polimerów zewnątrzkomórkowych EPS, warunki syntezy, ich właściwości i charakterystykę organizmów syntetyzujących je jak: bakterie, grzyby i glony. Dodatkowo zestawiła w tabeli (2) taksony glonów, Chlorophyta i Ochrophyta (Eustigmatophyta), syntetyzujących EPS. Zwróciła uwagę na rolę związków EPS w glebie podkreślając, że mikroorganizmy glebowe wytwarzające EPS przyczyniają się do agregacji i stabilizacji cząstek gleby i wspomagają utrzymanie jej wilgotności. Bardzo ciekawe są omówione przez Kandydatkę możliwości zastosowania właściwości flokulacyjnych polimerów zewnątrzkomórkowych w rolnictwie do poprawiania struktury gleby i jej rekultywację przez wykorzystanie ich właściwości biosorpcyjnych. Na bazie obserwacji własnych i literatury Kandydatka podkreśla, że EPS jako naturalny materiał skutecznie poprawia właściwości fizykochemiczne gleby.

Jako główny cel rozprawy Kandydatka przedstawiła „określenie wpływu wybranych czynników abiotycznych na syntezę zewnątrzkomórkowych polimerów przez wyselekcjonowane jednokomórkowe glony, analizę składu chemicznego otrzymanych polimerów oraz określenie ich właściwości sorpcyjnych i flokulacyjnych”. Do jego realizacji wyznaczyła 6 poprawnie sformułowanych zadań badawczych, w których zwróciła uwagę na: dobór odpowiednich gatunków glonów jednokomórkowych w oparciu o ich osobniczą wydajność syntezy egzopolisacharydów (EPS); znaczenie wpływu natężenia światła, źródła i stężenia azotu oraz sposobu odżywiania (auto i miksotroficzne); analizę biochemiczną otrzymanych EPS w warunkach laboratoryjnych; zbadanie zdolności sorpcyjnych EPS wobec jonów metali ciężkich np. kadmu i ołowiu oraz grup funkcyjnych występujących w EPS.

Kolejne zadania i hipotezy weryfikowała wykorzystując jako materiał badawczy 4 taskony glonów: *Chlorella vulgaris* Beijerinck, *Parachlorella kessleri* (Fott & Novakova) Krenitz, E.H. Hegewald, Hepperle, V. Huss, T. Rohr & M. Wolf, *Tetrademus obligus* (Turpin) M.J. Wyne i *Vischeria magna* (J.B. Petersen) Kryvenda, Rybalka Wolf & Friedl. Uważam, że obiekty badań zostały bardzo dobrze wybrane, jak wynika z moich obserwacji są to gatunki odporne na wysuszenie i dobrze rozwijają się na podłożach wilgotnych w wodach słodkich i słonawych. Należy podkreślić, że po przeprowadzonej analizie wydajności i specyficznej produktywności EPS, z badań kandydatka słusznie wycofała *Tetrademus obligus* (Turpin) M.J. Wyne, który charakteryzował się najniższą specyficzną produktywnością.

W kolejnych podrozdziałach *materiał i metody* Kandydatka bardzo szczegółowo omówiła użyte w badaniach techniki i metody analityczne: do badań taksonomicznych, biochemicznych, fizjologicznych, fizycznych i chemicznych oraz metody analiz statystycznych. Uważam, że zostały one bardzo dobrze dobrane i wykorzystane, efektem czego jest realizacja kolejnych zadań badawczych i potwierdzenie hipotez. Bardzo ciekawe okazało się zastosowanie w badaniach między innymi spektroskopii fourierowskiej FTIR pozwalającej na określenie zmian w strukturze EPS wytwarzanych w warunkach autotroficznych i miksotroficznych.

W oparciu o uzyskane wyniki badań, przedstawione w maszynopisie rozprawy doktorskiej, oraz załączone manuskrypty prac opublikowanych (P1, P2, P3) Kandydatka omawia je szczegółowo w wyczerpującym rozdziale (4) Wyniki. Kandydatka umiejętnie przedstawiła uzyskane rezultaty wszystkich części pracy doktorskiej tych opublikowanych i przedstawionych jako manuskrypt. Zbadała i określiła wpływ rodzaju i stężenia źródła azotu, oraz natężenia światła na syntezę i skład chemiczny zewnątrzkomórkowych polimerów EPS wytwarzanych przez jednokomórkowe glony *C. vulgaris*, *P. kessleri* i *V. magna*. Dowiodła również, że warunki odżywiania wpływają na skład chemiczny i właściwości sorpcyjne badanych EPS. Zbadała także właściwości flokulacyjne polimerów EPS i ich zdolności do usuwania jonów kadmu (II) i ołowiu (II) z roztworów wodnych.

Bardzo ciekawe, autorskie podsumowanie badań Kandydatka zamieściła w 15 stronicowym rozdziale (5) szeroko dyskutując otrzymane wyniki z rezultatami innych autorów. W dyskusji stwierdza jednoznacznie, że użyte do badań taksony *Chlorella vulgaris*, *Parachlorella kessleri* i *Vischeria magna* mają najwyższą wydajność syntezy polimerów zewnątrzkomórkowych spośród badanych gatunków glonów co moim zdaniem, daje impuls do kontynuowania badań i zajęcia się mikroglonami dla celów syntezy polimerów EPS.

Znaczące w mojej opinii okazały się wyniki, w których Kandydatka dowiodła, że produktywność całkowitego EPS w obecności mocznika jest znacznie niższa niż na podłożu zawierającym azotan sodu (NaNO₃). W tym układzie wyższa jest zarówno wydajność, jak i

specyficzna produktywność EPS, dlatego jak uznała Kandydatka związek ten może być stosowany jako źródło azotu w dalszych badaniach.

W dyskusji podkreśla że najważniejszymi właściwościami zewnątrzkomórkowych polimerów jest ich naturalne pochodzenie, biodegradowalność i nietoksyczność (Babiak i Krzemińska, 2021) i podawane wcześniej przez innych autorów potencjał sorpcyjny, flokulacyjny i konsystencjotwórczy (żelowanie i emulsyfikacja). Po zapoznaniu się z przedstawionymi wynikami badań zawartych w manuskrypcie pracy oraz z już opublikowanymi stwierdzam, że Kandydatka zweryfikowała hipotezy badawcze, zestawiając wnioski w rozdziale szóstym. Niewątpliwie dla dalszego rozwoju badań nad EPS wśród mikroorganizmów są wyniki potwierdzające syntezę EPS w warunkach mikсотroficznych, Kandydatka potwierdziła że badane EPS z hodowli mikсотroficznych zawierały bogatą paletę różnorodnych węglowodanów, co moim zdaniem zachęci badaczy do włączenia do badań na szerszą skalę organizmów wiciowców mikсотroficznych. Pragnę podkreślić, że dzięki tak szeroko zakrojonym badaniom Kandydatki otrzymaliśmy pełną, wieloaspektową analizę warunków syntezy, składu chemicznego i właściwości zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS) wytwarzanych przez trzy gatunki mikroskopijnych zielenic. Ważnym rezultatem badań jest też przybliżenie cech autekologicznych badanych taksonów na poziomie fizjologicznym, biochemicznym. Wyrażam nadzieję, że badania te będą się nadal rozwijały w szerokim kierunku aplikacyjnym i jako obiekty zostaną też włączone wspomniane formy wiciowcowe glonów czy też np. słodkowodne gatunki krasnorostów.

4. Ogólna ocena pracy

Po zapoznaniu się z wynikami pracy doktorskiej stwierdzam, że podjęte badania nad właściwościami mikroskopijnych glonów w syntezie związków zewnątrzkomórkowych EPS będzie się rozwijała w kolejnych dekadach. Kandydatka przyczyniała się do przybliżenia tej ważnej i nowoczesnej tematyki badawczej w kraju. Jej badania potwierdzają konieczność poznania gatunków słodkowodnych i glebowych glonów jednokomórkowych syntetyzujących polimery czasowo lub stale. Kandydatka potwierdziła uzyskanymi wynikami badań, że gatunki syntetyzujące polimery zewnątrzkomórkowe pomagają w utrzymaniu wilgotności gleby, stanowią ważny element glebotwórczy bowiem większość z nich jest zdolna do tworzenia biofilmu mają więc olbrzymie znaczenie w obecnym okresie globalnego ocieplenia klimatu. Kandydatka słusznie podkreśla, że biofilm zatrzymuje wodę i składniki mineralne, a także stabilizuje podłoże, dzięki czemu sprzyjają zasiedlaniu terenów przez rośliny naczyniowe. W mojej ocenie Praca doktorska Pani mgr Wiolety Ciempieli jest istotnym osiągnięciem w zakresie badań fykologicznych, bowiem wnosi nowe dane o autekologii gatunków glonów wydzielających zewnątrzkomórkowe substancje zawierające polimery (EPS). Warty podkreślenia jest fakt przeprowadzenia po raz pierwszy przez Kandydatkę kompleksowej analizy EPS syntetyzowanego przez hodowle *Vischeria magna* w warunkach autotroficznych i mikсотroficznych co stanowi drugie doniesienie w świecie. Sądzę, że opublikowanie w całości wyników badań zaowocuje wzrostem zainteresowania problematyką badań biochemicznych zewnątrzkomórkowych związków EPS będących często składnikami galaretowatych substancji (nazywanych w j. angielskim mucilage) składających się głównie z polisacharydów, wydzielanych przez mikroorganizmy roślinne i zwierzęce.

Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym i przygotowana starannie. Część graficzna rozprawy jest dobrze opracowana, przedstawiona i opisana zarówno w tekście maszynopisu jak i w pracach będących częściami składowymi całości.

W świetle przeprowadzonej analizy pracy doktorskiej, danych dotyczących rozwoju naukowego Kandydatki, wysoko oceniam jej udział w projekcie badawczym,

jako wykonawcy Sonata 12, nr 20216/23/D/NZ9/02670. Nie mam wątpliwości, że udział Kandydatki w pracach badawczych pozwolił jej na nabycie umiejętności współpracy zespołowej w grupie doświadczonych badaczy pod kierunkiem dr hab. Izabelli Krzemińskiej. Rezultaty tego, są uwidocznione w wieloautorskich publikacjach naukowych, stanowiących ważną część pracy doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel. Biorąc pod uwagę parametry bibliometryczne czasopism (IF) dla *Molecules* = 4.6 i *Energies* = 3.2, wg. wykazu bazy Research Gate praca przeglądowa z 2021 roku miała aż 66 cytowań, a druga z 2023 roku już 7 cytowań. Pani mgr Wioleta Ciempiel w krótkim okresie zdołała uzyskać Index Hirscha 2, przy ogólnej liczbie 75 cytowań Jej czterech publikacji. Pragnę podkreślić, że Kandydatka została w ostatnim czasie beneficjentką projektu NCN Preludium 22, którego realizację rozpocznie w 2024 roku.

4.1. Uwagi krytyczne

Zauważyłem kilka uchybień, drobnych błędów w maszynopisie pracy doktorskiej Pani mgr Wiolety Ciempiel, które powinny być moim zdaniem poprawione przed oddaniem pracy do druku:

- Kandydatka nie zwróciła uwagi na obowiązujące obecnie nazwy taksonomiczne bakterii, glonów, które cytuje za innymi autorami na str. 14-ej, 18-ej, Tabela 2 i tab. 3 zatytułowanej Systematyka ..., np. podaje nazwę taksonu z nazwiskiem badacza glonów ale nie autorem gatunku *Dictyosphaerium tetrachutum* Ružicka i *D. tetrachutum* Fott a wiadomo, że obecnie obowiązuje nazwa *Hindakia tetrachutum* (Printz) C. Bock, Pröschold & Krienitz;
- Kandydatka nie podaje też nazwisk autorów taksonów glonów, które były przedmiotem jej badań, zwykle podaje się pełną nazwę gatunku wraz nazwiskiem jego autora przy pierwszym cytowaniu w pracy (np. str. 26), konieczne więc będzie uzupełnienie nazwisk dla taksonów: *Parachlorella kessleri* (Fott & Novakova) Krenitz, *E.H. Hegewald*, *Hepperle*, *V. Huss*, *T. Rohr & M. Wolf*; *Chlorella vulgaris* Beijerinck; *Vischeria magna* (J.B. Petersen) Kryvenda, Rybalka Wolf & Friedl; *Tetrademus obliquus* (Turpin) M.J. Wyne;
- w maszynopisie pracy zamieszczone fotografie niektórych mikroorganizmów, są one bardzo złej jakości i nie odzwierciedlają rzeczywistego obrazu fenotypów taksonów, dotyczy to Ryc. 1. Str. 27.

Pragnę zauważyć, że moje uwagi, nie mają wpływu na wartość merytoryczną pracy.

W manuskrypcie pracy doktorskiej Kandydatka powołuje się na definicję polimerów zewnątrzkomórkowych za (Mazéas i in., 2023) jak następuje „*Polimery zewnątrzkomórkowe są to metabolity wtórne syntetyzowane między innymi przez jednokomórkowe glony i wydzielane na zewnątrz komórki w odpowiedzi na niekorzystne zmiany warunków środowiska*”. Warto moim zdaniem przedyskutować czy to zjawisko jest tylko odpowiedzią na stres? Znamy dokładnie proces wydzielania przez jednokomórkowe wiciowce np. eugleniny (Euglenaceae) na powierzchnię pellikuli spore ilości śluzu (mucilage) przez umieszczone pod pellikulą ciała śluzowe (muciferous body), który zawiera około 15% białka i 85-90% węglowodanów, w różnych sytuacjach życiowych jak: rozmnażanie, spoczynek, stres środowiskowy. Wydaje się więc, że proces syntetyzowania metabolitów wtórnych nie tylko jest odpowiedzią na stres związany z niekorzystnymi warunkami środowiska, proszę o opinię Kandydatki w tej sprawie.

5. Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przygotowana przez Panią mgr Wioletę Ciempiel rozprawa doktorska, pod opieką promotorską dr hab. Izabeli Krzemińskiej i promotor pomocniczego dr Magdalenę Czemierną świadczy o posiadaniu przez Kandydatkę wystarczającej wiedzy teoretycznej w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Zaplanowane i wykonane kompleksowo badania oraz interpretacja uzyskanych wyników i opublikowaniu ich w liczących się czasopismach naukowych (Ciempiel i inni 2021, 2022) dowodzi, że Pani mgr Wioleta Ciempiel jest dobrze przygotowana do samodzielnego prowadzenia badań naukowych i pracy w zespole. W mojej ocenie opiniowana praca jest oryginalnym, wieloaspektowym opracowaniem badawczym dostarczającym wiele nowych danych o autekologii gatunków glonów i możliwości wykorzystania ich właściwości osobniczych do produkcji różnych związków chemicznych dla przemysłu np. farmaceutycznego. Praca ma dużą wartość aplikacyjną, bowiem dotyczy zagadnień i możliwości wykorzystania właściwości biochemicznych zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS), które odgrywają znaczącą rolę w procesach glebotwórczych. Na podkreślenie zasługuje poważne zaangażowanie się Kandydatki w badania naukowe, bowiem zamierza rozwijać je badając tym razem możliwość wykorzystania zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS) syntetyzowanych przez jednokomórkowe zielonice (Chlorophyta) w procesach biodegradacji ołowiu w ramach otrzymanego projektu Preludium 22.

Stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Wiolety Ciempiel spełnia wymagania stawiane pracy doktorskiej zgodnie z zapisami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668, z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Ciempiel do dalszego postępowania kwalifikacyjnego przewidzianego w procedurze do uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.



Prof. dr hab. Konrad Wołowski