

Lublin, 30.01.2024 r.

Prof. dr hab. Barbara Pawlik-Skowrońska
Katedra Hydrobiologii i Ochrony Ekosystemów
Wydział Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Wiolety Ciempiel

pt. " Określenie warunków syntezy, składu chemicznego i właściwości zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS) wytwarzanych przez wybrane jednokomórkowe glony"

zrealizowanej pod kierunkiem promotora dr hab. Izabeli Krzemińskiej oraz promotora pomocniczego dr Magdaleny Czemińskiej

Podstawą wykonania opinii jest pismo Pana prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego, Dyrektora Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, z dnia 14.12.2023 r.

Ocena formalna

Przedstawioną do oceny pracę doktorską mgr Wiolety Ciempiel stanowi manuskrypt oraz załączone 2 publikacje, w tym jedną pracę przeglądową pt. " Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts : a review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes" oraz jedną pracę oryginalną, w której opublikowano część wyników badań stanowiących dorobek doktorantki pt. "Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities". Załączone wielo-autorskie publikacje ukazały się kolejno w 2021 i 2022 r. w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach *Energies* (IF w 2023 r. = 3.2) and *Molecules* (IF = 4.6) notowanych w bazie Web of Science. Sumaryczna wartość punktowa tych czasopism na liście MEiN wynosi 240 punktów i są one skategoryzowane jako przynależne do dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. W obydwu pracach mgr Wioleta Ciempiel jest pierwszą autorką i

deklaruje współdziałał w opracowaniu koncepcji prac, oraz na wszystkich etapach prowadzenia badań i przygotowania publikacji, co zostało potwierdzone stosownymi oświadczeniami. Jak podaje autorka, część pozostałych wyników badań, przedstawionych w manuskrypcie rozprawy doktorskiej została opracowana w formie manuskryptu trzeciej wielo-autorskiej publikacji, który został złożony do wydawnictwa, lecz nie podano do którego. Zgodnie z oświadczeniami współautorów, we wszystkich dołączonych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym doktorantki.

Ocena merytoryczna

1. Tematyka badań i jej znaczenie

Oceny rozprawy doktorskiej dokonano na podstawie przesłanego manuskryptu z dołączonymi kopiami 2 publikacji oraz oświadczeniami współautorów. W manuskrypcie pracy wyróżniono następujące rozdziały: streszczenie w języku polskim, abstrakt w języku angielskim, wprowadzenie, cel pracy i hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz bibliografia. W części rozprawy określonej jako "wprowadzenie" autorka dokonała syntetycznego przeglądu literatury (wraz z danymi bibliograficznymi) dotyczącej egzogennych polimerów stanowiących naturalne metabolity bakterii, grzybów i glonów. Przedstawiony został stan najnowszej wiedzy na temat ich składu, właściwości sorpcyjnych i flokulacyjnych oraz roli w środowisku wodnym i glebowym, szczególnie zanieczyszczonym toksycznymi metalami (kadm i ołów) oraz potencjalnego znaczenia aplikacyjnego tych metabolitów. Rozdział ten zawiera informacje opublikowane w 2021 r. w formie przeglądowej pracy (wskazanej w części Ocena formalna), co zasługuje na uznanie, ponieważ podsumowuje nie tylko dotychczasowy stan wiedzy dotyczący zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS) produkowanych przez mikroorganizmy, ale również wskazuje na niedostatki w tej wiedzy. W kontekście zależności pomiędzy produkcją naturalnych egzopolimerów i ich składu chemicznego a zmiennymi warunkami środowiskowymi oraz gatunkami mikroorganizmów je produkujących, autorka podkreśla brak lub niedostateczny poziom informacji na temat wpływu takich czynników abiotycznych jak natężenie światła, temperatura, rodzaj i stężenie związków azotu i węgla oraz pH na produkcję, skład chemiczny, właściwości sorpcyjne względem toksycznych metali (Cd i Pb) oraz właściwości flokulacyjne rozpuszczalnych egzopolimerów syntetyzowanych przez gatunki jednokomórkowych glonów. Z tych względów autorka podjęła szerokie badania z udziałem kilku gatunków i szczepów należących do różnych grup systematycznych (głównie

zielenic oraz różnowiciowych). Zdolność tych fotosyntetyzujących mikroorganizmów do produkcji pozakomórkowych metabolitów została poznana w nieznacznym stopniu lub, jak w przypadku *Vischeria magna* (poprzednio *Eustigmatos magnus*), zupełnie nie była badana. Wiele gatunków glonów, w tym glebowe i wodne należące do klasy Eustigmatophyceae posiadają wysoki potencjał bio-ekonomiczny, ze względu na wydajną produkcję związków (karotenoidy, aminokwasy, kwasy tłuszczowe) o coraz szerszym zastosowaniu i z tego powodu zainteresowanie nimi wzrastało w ostatnich latach. Podjęcie prac na *V. magna*, posiada dodatkową wartość, gdyż gatunek ten (syn. *E. magnus*) należy do tego rodzaju glebowych glonów, które występują na terenach skażonych metalami ciężkimi. Recenzent wyraża nadzieję, że w kolejnych publikacjach na temat sorpcji Cd i Pb przez egzopolimery *V. magna* doktorantka sięgnie po dostępne na ten temat prace innych autorów. Wiele gatunków glonów należących do klasy Eustigmatophyceae i innych nie zostało jak dotąd wystarczająco poznanych pod względem produkcji pozakomórkowych metabolitów, co w pełni uzasadnia podjęte przez doktorantkę badania..

2. Cele i hipotezy badawcze

Doktorantka przedstawiła ogólny oraz szczegółowe cele swojej pracy doktorskiej obejmujące badania nad wpływem kilku abiotycznych czynników środowiskowych, które mogą mieć wpływ na produkcję, skład chemiczny, właściwości sorpcyjne względem kadmu i ołowiu oraz flokulacyjne egzopolimerów (EPS) produkowanych przez różne gatunki/szczepy jednokomórkowych glonów oraz sprecyzowała 4 następujące hipotezy badawcze :

a/ Natężenie światła, źródła i stężenie azotu oraz sposób odżywiania jednokomórkowych glonów wpływają na proces syntezy wyrażony jako wydajność i specyficzną produktywność badanych EPS.

b/ Natężenie światła oraz sposób odżywiania powodują zmiany w składzie chemicznym EPS syntetyzowanych przez jednokomórkowe glony.

c/ Skład chemiczny EPS i dostępność grup funkcyjnych wpływa na właściwości sorpcyjne badanych egzopolisacharydów.

d/ Specyficzność gatunkowa i warunki fizyko-chemiczne układu wpływają na właściwości flokulacyjne badanych EPS.

Hipotezy badawcze są postawione w zasadzie prawidłowo, chociaż w hipotezie pierwszej niezręczne jest sformułowanie dotyczące wpływu na " proces syntezy" EPS. Sam proces syntezy nie był bowiem badany, a jedynie produkcja EPS. Ponadto, w hipotezie trzeciej, nie jest jasne czy autorka zamierzała badać właściwości sorpcyjne egzopolisacharydów czy egzopolimerów, złożonych przecież nie tylko z cukrów ale także aminokwasów, związków fenolowych etc. Należało używać bardziej precyzyjnych sformułowań.

3. Metody badań

Rozdział Materiały i metody został napisany w sposób dość przejrzysty, chociaż autorka nie ustrzegła się kilku wymagających wyjaśnienia niedociągnięć :

- w opisie materiału badawczego , który stanowił różnowiciowy glon *Vischeria magna* nie podano numeru szczepu pozyskanego z kolekcji kultur, a w przypadku szczepów o wartości biotechnologicznej, do których należą także różne glony z klasy Eustigmatophyceae, informacja taka jest niezbędna. Jak wykazano w rozprawie, w przypadku 4 różnych szczepów *Chlorella vulgaris* produktywność i skład chemiczny EPS może być inny w tych samych warunkach hodowlanych. Ponadto, byłoby wskazane, aby zamieścić informację (wraz ze wskazaniem odpowiedniego źródła literaturowego), że *Vischeria magna*, poprzednio (przed 2018 rokiem) klasyfikowana była jako *Eustigmatos magnus*. Na podstawie analiz molekularnych połączono bowiem niektóre gatunki z rodzajów *Eustigmatos* i *Vischeria* w jeden rodzaj *Vischeria*. Poza tym, należałoby wskazać czy użyte w pracy szczepy, pochodzące z różnych kolekcji kultur glonowych , były akseńiczne, gdyż bakterie heterotroficzne obecne na powierzchni komórek glonów mogą także być zdolne do produkcji zewnątrzkomórkowych polimerów.

- w opisie hodowli wstępnych oraz hodowli doświadczalnych konieczne jest wskazanie jakie konkretnie inokulum zastosowano; hodowle o tej samej gęstości optycznej mogą składać się z różnej ilości komórek, różniących się rozmiarami (co widać na załączonych w pracy fotografiach) i suchą masą. Konieczne jest również wskazanie nie tylko natężenia zastosowanego oświetlenia, ale także zastosowanego źródła światła, które może mieć znaczący wpływ na przebieg procesu fotosyntezy, a co za tym idzie różnych metabolitów. Poza tym, recenzent zauważył rozbieżność pomiędzy zastosowaną w eksperymentach temperaturą: w manuskrypcie (Tabela 5) podano 25 ° C a w opublikowanej pracy oryginalnej (21 °C). W tab. 5 podano zastosowanie natężenia światła 400, a w opisanych w wynikach

350 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; inny jest też czas hodowli przy różnych źródłach węgla: 25 dni wskazane w tabeli 5 vs 15 dni w opisie.

- niezbyt klarowny jest również opis 3.2.3. dotyczący izolacji EPS. Nie podano skąd pochodzi zastosowano metodyka (własna autorki czy pozyskana ze źródeł literaturowych) oraz jak zróżnicowano EPS całkowity od rozpuszczalnego w wodzie, a takie formy przedstawiono w kilku tabelach w rozdziale "Wyniki".

Jednakże, pomimo powyższych uwag należy podkreślić, że dla osiągnięcia postawionych celów zastosowano w pracy cały szereg nowoczesnych metod mikrobiologicznych oraz chemicznych i fizycznych takich jak: spektrofotometria, chromatografia cienkowarstwowa, spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera, optyczna spektrometria emisyjna z indukcyjnie sprzężoną plazmą, turbidometria i analiza wielkości cząstek w gradiencie sacharozy, dzięki którym możliwe było przeanalizowanie zawartości cukrów, białka związków fenolowych, kwasów uronowych, aminokwasów, aminocukrów oraz monosacharydów w syntetyzowanych polimerach oraz grup funkcyjnych zdolnych do wiązania Cd i Pb. Zidentyfikowano również grupy funkcyjne oraz oznaczono pierwiastki (Ca, Mg, Mn, P, S, Zn), które mogą być obecne, wiązane przez glonowe EPS lub z nich uwalniane. Wszystkie te metody zostały szczegółowo opisane wraz ze wskazaniem zastosowanej aparatury i źródeł literaturowych.

4. Wyniki badań i dyskusja

W rozdziale "Wyniki" autorka opisała i przeanalizowała rezultaty przeprowadzonych badań, których pierwszym etapem była selekcja siedmiu gatunków lub szczepów jednokomórkowych glonów syntetyzujących pozakomórkowe polimery (EPS). Na podstawie analizy ich specyficznej produktywności oraz porównania zawartości w nich cukrów i białek autorka wybrała do dalszych badań 3 taksony: dwie zielenice: *Parachlorella kessleri* i *Chlorella vulgaris* szczep 898 oraz jeden gatunek glonów różnowiciowych *Vischeria magna*. Nie została jednak podana informacja czy dane, przedstawione w Tabeli 6, dotyczą całkowitych czy rozpuszczalnych EPS, które to frakcje były następnie różnicowane w kolejnych etapach badań. Można się również jedynie domyślać, że specyficzna produktywność wyrażona została w przeliczeniu na g suchej masy glonów. W badaniach nad znaczeniem różnych źródeł azotu (azotan sodu, mocznik, azotan amonu i siarczan amonu) dla produktywności pozakomórkowych polimerów autorka stwierdziła, że jedynie azotan sodu i w znacznie mniejszym stopniu mocznik umożliwiały przyrost biomasy glonowej oraz

produkcję EPS (wyrażanych jako całkowite i rozpuszczalne w wodzie) . Najbardziej efektywnym producentem polimerów w zastosowanych warunkach okazała się zielenica *Parachlorella kessleri* i tu znów należy się jedynie domyślać, że dane te zostały wyrażone w przeliczeniu na g .s.m. glonów. Autorka stwierdziła, że najwyższa specyficzna produktywność EPS miała miejsce w warunkach stresu spowodowanego brakiem źródła azotu, hamującego jednocześnie wzrost glonów. Natomiast maksymalna wydajność i specyficzna produktywność występowała w warunkach hodowli z dodatkiem 1,5 g/l NaNO_3 i była podobna u obu zielenic oraz była tylko nieco niższa u *V. magna*. Niestety, problem niedoboru makroelementów dla wzrostu glonów i produkcji pozakomórkowych metabolitów, głównie polisacharydów, został w manuskrypcie rozprawy przedyskutowany dość powierzchownie, chociaż autorce znana była i cytowana przeglądowa publikacja Laroche z 2022r. Istotnym wynikiem badań było stwierdzenie, że zastosowane najwyższe natężenie światła ($350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) było najkorzystniejsze dla wzrostu biomasy glonów oraz dla produktywności EPS. I w tym wypadku ważna jest informacja dotycząca wielkości inokulum zastosowanego w eksperymentach, gdyż dla hodowli glonów o różnych gęstościach określone natężenie światła fotosyntetycznie czynnego może być czynnikiem optymalnym lub stresującym. Zdaniem recenzenta, wyniki dotyczące porównania wpływu azotu i natężenia światła na produkcję egzopolimerów przez 3 różne gatunki glonów zasługują na oddzielną publikację po ich głębszym i dokładniejszym opracowaniu . Ważnym osiągnięciem jest określenie składu glonowych EPS w zależności od natężenia światła, dzięki któremu wskazano że natężenie światła ma istotne znaczenie dla zawartości aminokwasów, białek, cukrów redukujących , kwasów uronowych, etc. bogatych w grupy funkcyjne karboksylowe, karbonylowe i hydroksylowe i inne biorące udział w sorpcji jonów metali.

Istotnym elementem badań było również określenie wpływu różnych warunków hodowli glonów pod względem dostępności form węgla (jedynie nieorganiczny dwutlenek węgla vs dodatek organicznego węgla z glukozy) oraz pH dla produktywności EPS i ich efektywności w sorpcji toksycznych jonów kadmu i ołowiu. Stwierdzono, że warunki miksotroficzne (hodowle z dodatkiem glukozy) były bardziej korzystne zarówno dla produktywności EPS i ich składu biochemicznego oraz z wiązanych z nim grup funkcyjnych, istotnych ze względu na właściwości sorpcyjne EPS . Najbardziej efektywna pod tymi względami, w zastosowanych w badaniach warunkach eksperymentalnych, okazała się *Chlorella vulgaris* szczep 898. Recenzent zwraca uwagę na niezręczność sformułowania występująca w tytułach podrozdziałów 4,5 i 4,6 manuskryptu oraz w tytułach kilku tabel z

wynikami, a dotyczącą określeń " autotroficzne EPS" i miksotroficzne EPS". Określenia te odnoszą się do sposobu odżywiania się glonów lub warunków hodowli ale nie do substancji produkowanych przez glony.

W kontekście hipotetycznego wykorzystania pozakomórkowych polimerów glonowych do poprawy jakości gleb, autorka zbadała właściwości autoflokulacyjne hodowli zielenicy *P. kessleri* (nie jest jasne dlaczego tylko tego jednego gatunku) oraz właściwości flokulacyjne roztworów pozakomórkowych EPS produkowanych przez *P. kessleri*, *Ch. vulgaris* i *V. magna* za pomocą określenia zmian mętności zawiesiny kaolinu i pomiaru wielkości agregatów cząstek zawiesin. Przy braku opisu w rozdziale metodycznym dotyczącego przeprowadzenia eksperymentu na hodowlach *P. kessleri*, wyniki przedstawione na Ryc. 7. budzą wątpliwości. Rodzi się pytanie czy autorka rzeczywiście obserwowała autoflokulację, czy raczej sedymentację komórek w hodowlach o coraz większej gęstości związanej z coraz wyższym stężeniem azotu w pożywce. Nie podano czasu trwania hodowli przed eksperymentem i można przypuszczać, na co wskazuje barwa, że hodowla prowadzona przy braku źródła azotu zawierała martwe komórki. Doktorantka stwierdziła istnienie właściwości flokulacyjnych egzopolimerów wszystkich badanych glonów, których efektywność EPS była specyficzna dla poszczególnych gatunków i zależna od pH roztworów EPS. Dane te poszerzyły stan wiedzy w tym zakresie, jednakże w dyskusji uzyskanych wyników, w momencie ich publikowania, interesujące byłoby wskazanie zalet ale również ograniczeń dotyczących możliwości ewentualnego zastosowania tych glonowych metabolitów do celów praktycznych.

Stwierdzam, że wyniki badań uzyskane przez doktorantkę wraz ze współpracującym zespołem znacząco poszerzają stan wiedzy w zakresie poznania właściwości pozakomórkowych polimerów syntetyzowanych przez glony oraz optymalizacji warunków ich produkcji przez hodowle glonów, co zostało uzasadnione w prawidłowo przeprowadzonej dyskusji w oparciu o najnowsze źródła literaturowe. Uzyskane wyniki posiadają również pewien aspekt aplikacyjny jako naturalne substancje o interesujących właściwościach w kontekście zanieczyszczenia gleb lub wód metalami ciężkimi. W manuskrypcie rozprawy występuje szereg niedociągnięć redakcyjnych, jednak przedstawione przez recenzenta uwagi i sugestie nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy oraz przedstawionych w niej wyników. Rozprawę oceniam pozytywnie zarówno od strony formalnej jak i merytorycznej.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Wiolety Ciempiel spełnia wymogi określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.2023 po. 7420) i może stanowić podstawę do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

W związku z powyższym składam wniosek o dopuszczeniu mgr Wiolety Ciempiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Barbara Pawlik-Skowrońska