



Dr hab. Agnieszka Hanaka, prof. uczelni  
Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki  
Instytut Nauk Biologicznych  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
w Lublinie

Lublin, 08.02.2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel  
pt. „Określenie warunków syntezy, składu chemicznego i właściwości  
zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS) wytwarzanych przez wybrane  
jednokomórkowe glony”**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Wiolety Ciempiel została wykonana pod kierunkiem promotora dr hab. Izabeli Krzemińskiej z Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, Zakładu Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych oraz promotora pomocniczego dr Magdaleny Czemińskiej z Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) wykazują szereg interesujących właściwości i mogą być stosowane w różnych gałęziach przemysłu, choćby w rolnictwie, przemyśle spożywczym, kosmetycznym i w farmacji. Dotychczas komercyjne zastosowanie EPS wytwarzanych z jednokomórkowych glonów jest ograniczone ze względu na ich niską produktywność. Podjęta tematyka badawcza mająca na celu zweryfikowanie wybranych czynników na produktywność wytwarzanego przez glony EPS ma duży potencjał naukowy i aplikacyjny.





### **Ocena formalna rozprawy**

Recenzowana rozprawa liczy 154 numerowane strony i została napisana w języku polskim, natomiast dwie załączone publikacje zostały napisane w języku angielskim. Na początku spisu treści umieszczono kolejno streszczenie, abstrakt, listę publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz wykaz skrótów. Następnie pojawiają się zasadnicze numerowane rozdziały typowe dla prac eksperymentalnych, tj. Wprowadzenie, Cel pracy i hipotezy badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Bibliografia. Spis treści kończą rozdziały zawierające kolejno teksty publikacji, oświadczenia współautorów i życiorys naukowy. Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym, choć zdarzają się niedociągnięcia stylistyczne, interpunkcyjne, edytorskie czy nieścisłości.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w dwóch artykułach naukowych w języku angielskim. Jedna z tych prac to praca przeglądowa opublikowana w *Energies* w 2021 r. (P.1; IF 3,252; MEiN 140 pkt) i dająca dobry ogłąd na podejmowaną przez Doktorantkę tematykę badawczą. Druga praca została opublikowana w 2022 r. w *Molecules* (P.2; IF 4,6; MEiN 140 pkt). Trzecia praca (P.3) została wysłana do czasopisma i czeka na rozpatrzenie.

W każdej z trzech publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej Pani mgr Wioleta Ciempiel jest pierwszym autorem, co wskazuje na Jej znaczący wkład w ich powstanie. Praca przeglądowa ma dwóch autorów, natomiast prace eksperymentalne siedmiu lub sześciu autorów. Na podstawie załączonych oświadczeń, w przypadku pracy przeglądowej, Pani mgr Wioleta Ciempiel współuczestniczyła w pisaniu, edycji i korekcie manuskryptu oraz w opracowaniu problematyki i koncepcji, jak również finalnie w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami udziału w powstaniu obu prac eksperymentalnych, Doktorantka współuczestniczyła w opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodologii badań, przeprowadzeniu doświadczeń (prowadzeniu hodowli – wyłącznie w przypadku P.2, izolacji EPS, określeniu składu chemicznego i przeprowadzeniu doświadczenia sorpcji metali), analizie i interpretacji





uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, edycji i korekcie manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje – wyłącznie w przypadku P.2. Oznacza to, że Doktorantka partycypowała w każdym etapie tworzenia pracy, poczynając od budowania koncepcji, przez wykonanie badań w laboratorium, po przygotowanie odpowiedzi na pytania recenzentów. Zatem dzięki realizacji tak szerokiego zakresu działań przekonała, że zdobyła doświadczenie niezbędne w dalszych etapach rozwoju naukowego.

Warto nadmienić, że Doktorantka jest również współautorką publikacji spoza cyklu (Scientific Reports, IF 4,997; MEiN 140 pkt). Jest współautorką 21 doniesień konferencyjnych (w tym 9 – krajowych i 12 – międzynarodowych), a jedno z doniesień krajowych zostało wyróżnione. Była wykonawcą projektu SONATA 12 oraz złożyła projekt Preludium 22, który uzyskał finansowanie. Doktorantka uczestniczyła w popularyzacji nauki podczas XVI Lubelskiego Festiwalu Nauki.

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

Rozdział 1 jest dobrym wprowadzeniem w tematykę pracy. Zawiera charakterystykę EPS, warunki ich syntezy (z krótkim opisem m.in. składu podłoża hodowlanego, czy natężenia światła), organizmy syntetyzujące EPS (z uwzględnieniem bakterii, grzybów oraz wielo- i jednokomórkowych glonów), właściwości sorpcyjne (w tym czynniki fizykochemiczne od których zależy sorpcja) i flokulacyjne EPS (wieloczynnikowa zależność), rolę EPS w glebie, zanieczyszczenie środowiska kadmem i ołowiem oraz zasygnalizowanie możliwości stosowania EPS w rolnictwie. W tej części rozprawy znalazły się dwie tabele.

Ta część pracy nie jest wolna od pewnych niedociągnięć, które przytaczam poniżej.

Brakuje cytowania Tabeli 1 w tekście.

Na str. 13 w przedostatniej linijce dodałabym „alginian” do wymienianych najważniejszych EPS i zacytowałabym w tym miejscu Tab. 1. Z kolei w Tab. 1 uwzględniłabym pullan.





Powstały nieścisłości w bibliografii, np. brak w spisie pozycji Angelis i in. 2012 – 1.4.2, str. 15; Lupi i in. 1994 – 1.4.3.2, str. 17; Kumar i in. 2017 – Tab. 2, Mishra i Jha 2009 – Tab. 2, Guzman-Murillo i Ascencio 2000 – Tab. 2; Hu i in. 2003 – Tab. 2; Mahesh i in. 2019 – Tab. 2; Bařana 2013 – Tab. 2; Xie i in. 2021 – 1.5, str. 20.

W Tab. 2 w kolumnie „Warunki hodowli” dane powinny być konsekwentnie ustawione, np. zgodnie z kolejnością zaproponowaną przy gwiazdce (\*) pod tabelą, np. czas hodowli zawsze przed temperaturą, itp.

Poniżej przedstawiam kilka pyta, które mi się nasuwają po lekturze tej części rozprawy.

Str. 15; 1.4.2 – Dobrze byłoby krótko napisać, jakie zastosowanie mają EPS wytwarzane przez grzyby, choćby pullan, galaktan i glukan. Co obecnie wiadomo o ich właściwościach?

Str. 16; 1.4.3.1 – Nie ma jasności, czym jest agar, a czym agarozą. Poproszę o krótkie wyjaśnienie.

Str. 17; 1.4.3.2 – Warto byłoby wytłumaczyć pojęcie „biostymulatory roślin”, zważywszy, że to pojęcie pojawia się również w pracy na str. 22. Należałoby ustalić, w którym miejscu pracy najzręczniejszy byłoby ten temat poruszyć, aby się nie powtarzać.

Co wiadomo na temat efektywności flokulacji prowadzonej przy stosowaniu EPS w porównaniu z zastosowaniem konkretnych związków obecnych w EPS, np. kwasów uronowych? Jakie warunki powinien spełniać efektywny flokulant? Jakie właściwości powinien posiadać? Proszę poprzeć literaturą i badaniami własnymi.

Str. 22; 1.8 – Doktorantka napisała: „EPS wpływają pozytywnie na kiełkowanie roślin”. Proszę wyjaśnić, na jakie konkretne parametry EPS mogą wpływać, np. na energię kiełkowania, zdolność kiełkowania oraz średni czas kiełkowania? Doktorantka wymieniła też pozytywny wpływ EPS na aktywność fotosyntetyczną. Czym jest aktywność fotosyntetyczna? O jakich konkretnych parametrach aktywności fotosyntetycznej możemy mówić?





Pani mgr Wioleta Ciempiel prawidłowo sformułowała cel pracy. Głównym celem było określenie wpływu czynników abiotycznych na syntezę polimerów zewnątrzkomórkowych przez wyselekcjonowane gatunki glonów jednokomórkowych, określenie ich składu chemicznego oraz właściwości sorpcyjnych i flokulacyjnych. Dodatkowo przedstawiono sześć celów szczegółowych, które precyzyjnie uściślają rodzaje analiz, które zostały przeprowadzone. Dla osiągnięcia celów Doktorantka sformułowała cztery hipotezy badawcze.

W rozdziale Materiały i metody pokrótce opisano materiał badawczy przedstawiając zdjęcia glonów spod mikroskopu optycznego (zestawione w postaci jednej ryciny) i opisując ich systematykę (zestawiona w tabeli). Do badań włączono cztery gatunki jednokomórkowych glonów: *Chlorella vulgaris* (cztery szczepy oznaczone numerami 262, 267, 788 i 898), *Parachlorella kessleri*, *Tetrademus obliquus* i *Vischeria magna*. Same metody zawarto na 11 stronach rozprawy. Scharakteryzowano warunki hodowli glonów na podłożu stałym i płynnym, w tabeli umieszczono skład pożywki, opisano warianty podłoża hodowlanego – źródło azotu (w czterech formach: azotan sodu, azotan amonu, siarczan amonu i amoniak) i jego stężenie (azotan sodu: 0, 0,325, 0,75 i 1,5 g L<sup>-1</sup>) oraz źródło węgla (dodatek glukozy). Przedstawiono warunki prowadzenia hodowli jednokomórkowych glonów z uwzględnieniem m.in. natężenia światła (tabela). Opisano pomiar stężenia biomasy komórkowej, izolację i pomiar składu chemicznego EPS, włączając w to oznaczenie zawartości cukrów całkowitych, białka i związków fenolowych, a także hydrolizę EPS i pomiar zawartości cukrów redukujących, kwasów uronowych, aminokwasów i aminocukrów. Przeprowadzono chromatografię cienkowarstwową (TCL), zastosowano spektroskopię w podczerwieni (FTIR) oraz optyczną spektrometrię emisyjną (ICP-OES). Oznaczono również aktywność flokulacyjną (metoda kaolinowa), dokonano pomiaru zmian mętności i wielkości cząstek. Dane prawidłowo poddano analizie statystycznej.

W tej części pracy zdarzają się pewne nieścisłości, które komentuję poniżej.

Str. 28 – Składnik roztworu 1: „Na<sub>2</sub>Mg EDTA” – zamiast „Na<sub>2</sub>Mg EDTA”.





Str. 28 – W Tab. 4 dla jasności można byłoby uwzględnić roztwór 4:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Str. 29 – Brak przecinka, 6 linijka od góry, po nawiasie oraz brak wyjaśnienia skrótu „rpm”.

Proszę o ustosunkowanie się Doktorantki do kilku poniższych pytań.

Str. 29 – Dlaczego na początku nie napowietrzano hodowli?

Str. 30 – Proszę wyjaśnić różnice w podawanym natężeniu światła:  $350 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  vs. str.31, Tab. 5 –  $400 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Różnica między najniższą wartością natężenia światła ( $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a średnią ( $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) jest nieduża w porównaniu z najwyższą używaną wartością natężenia światła. Proszę wyjaśnić, na jakiej podstawie wybrano trzy stosowane w badaniach natężenia światła i określono jako LL, ML i HL?

Str. 38; 3.2.10 – Czy były dane nie spełniające kryterium normalności?

Wyniki zaprezentowano na 31 stronach rozprawy, włączając 10 rycin i 11 tabel. Generalnie, ryciny i tabele zostały poprawnie i czytelnie przygotowane oraz opatrzone wynikami testu statystycznego. Rozdział Wyniki podzielono na sześć podrozdziałów. Na ogół klarownie tłumaczono dokonywane wybory gatunków i czynników do dalszych badań oraz kluczowe wyniki. Wyjaśniono, że selekcja gatunków do dalszych badań opierała się na najwyższej wydajności i specyficznej produktywności EPS. Zatem z czterech gatunków wybrano trzy (*V. magna*, *P. kessleri* i *C. vulgaris*), a z czterech szczepów *C. vulgaris* wybrano jeden (szczep oznaczony numerem 898). Podobnie, jasno uzasadniono, wybór azotanu sodu do dalszych badań na podstawie najwyższego przyrostu biomasy komórkowej oraz wydajności i specyficznej produktywności całkowitego EPS. Przedstawiono wpływ natężenia światła na skład biochemiczny EPS oraz skład chemiczny i właściwości sorpcyjne autotroficznych (na podstawie P.2 – Pb i Cd) oraz miksotroficznych EPS (P.3 – Pb). Porównano widma FTIR EPS syntetyzowanych w warunkach auto- i miksotroficznych. Ostatni podrozdział poświęcono zaprezentowaniu właściwości flokulacyjnych EPS i skupiono się na *P. kessleri* oraz porównaniu trzech gatunków glonów.





Ta część rozprawy nie jest wolna od pewnych niedociągnięć w precyzji wypowiedzi.

Str. 39, ostatnie zdanie – Przedział  $600-700 \mu\text{g mL}^{-1}$  nie oddaje rzeczywistej rozpiętości, bowiem dla *C. vulgaris*  $898$  to  $577 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Str. 40, druga linijka od góry – Zgodnie z przyjętym systemem zaokrągleń powinno być 4,2, a nie  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Str. 42; 4.2.2 – „Natomiast hodowla ... takim samym przyrostem biomasy ... azot”. – Zbyt duże uproszczenie, bo czy 1 i  $0,9 \text{ g L}^{-1}$  to „taki sam przyrost biomasy” (na podst. Tab. 8)?

Str. 43; ostatnie zdanie – Brakuje precyzji wypowiedzi, np. „jest dwukrotnie wyższa”, „czterokrotny wzrost”, bo w rzeczywistości „jest ponad dwukrotnie wyższa”, „niemal czterokrotny wzrost” więc należałoby dokładnie skalkulować różnice i podać dokładne wartości liczbowe tych krotności.

Str. 45; ostatnie zdanie – Czy w przypadku *P. kessleri* ok. 4-krotny wzrost nie jest wyraźny? Proponuję stosować w takich przypadkach konkretne wartości krotności wówczas precyzja i jednoznaczność wypowiedzi będą bezdyskusyjne.

Str. 44; linijka druga od dołu – „66,5” czy „49,1” (na podst. Tab. 9)?

Str. 46, str. 48 – jest „natężenia światła” zamiast „natężenia światła”.

Ryc. 2 – dobrą praktyką jest zachowywać tę samą kolejność na wszystkich rycinach i we wszystkich tabelach. Tu kolejność glonów jest inna niż na pozostałych rycinach i w tabelach. Co oznacza skrót „Em”?

Str. 53 – jest „mikotroficzne” zamiast „miksotroficzne”.

Tam, gdzie to konieczne warto byłoby dodawać przy opisie pasm „około” – np. str. 58: „... pojawiają się pasma  $1730 \text{ cm}^{-1}$ ...” – lepiej „około 1730”, bo zaznaczono  $1724 \text{ cm}^{-1}$  oraz str. 62: „około”, np. przy  $2924$ , czy  $2850 \text{ cm}^{-1}$ .

Str. 59 – „Uzyskane wyniki ... wciągu pierwszych 5 minut ...” – Zgodnie z Tab. 13 potencjał usuwania jonów dla *P. kessleri* po 5 min i 60 min jest podobny.

Str. 60; Tab. 13 – brak wyjaśnienia skrótu „RP”.





Str. 61, str. 62 – „w zakresie 1750-1200  $\text{cm}^{-1}$ ” vs. str. 63, Ryc. 6 „1750-1180  $\text{cm}^{-1}$ ”.

Str. 62 – Łatwiej byłoby śledzić tekst, gdyby Doktorantka cytowała odniesienia do odpowiednich części Ryc. 6.

Str. 46 – „Najwyższe stężenia białek i aminokwasów ...” – Czy dla aminokwasów to stwierdzenie jest słuszne (na podst. Ryc. 2)? „W przypadku EPS ...” – Czy dla *V. magna* to stwierdzenie jest słuszne?

Str. 48; linijki 4-2 od dołu strony – „Natężenie światła ... EPS” – Czy to zdanie jest słuszne dla *Cv* i *Pk*?

Poza uwagami dotyczącymi precyzji wypowiedzi mam pytanie.

Str. 59 – Proszę o wytłumaczenie, dlaczego do badań wybrano pH 4, 5 i 6.

Dobrym zabiegiem ułatwiającym śledzenie tekstu było wyróżnienie w dyskusji czterech części. W każdej z tych części dyskutowano kolejno następujące zagadnienia: źródło i stężenie azotu, natężenie światła, skład chemiczny EPS i właściwości sorpcyjne oraz właściwości flokulacyjne.

W Dyskusji również byłoby czytelniej dodać cytowania odpowiednich rycin, np. na str. 76 w akapicie „Analiza widm ...”, czy na str. 81 w akapicie „Modyfikacja wartości ...”.

W rozdziale poświęconym zaprezentowaniu wniosków końcowych znalazło się 10 podpunktów. Zaprezentowane wnioski mają uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach i uzyskanych wynikach. W celu doprecyzowania, we wniosku 2 dodałabym „całkowitego” do „EPS”. Na podstawie danych zamieszczonych na Ryc. 2 wniosek z punktu 4 dotyczący wyboru optymalnego natężenia światła, nie jest słuszny. Dlaczego przyjęto, że do oceny kluczowe są zawartości kwasów uronowych i aminokwasów? Jaka jest opinia Doktorantki na temat realnej przemysłowej aplikacyjności uzyskanych EPS w świetle przeprowadzonych badań? Proszę o komentarz Doktorantki.







W Bibliografii uwzględniono 155 pozycji literatury anglojęzycznej. Doktorantka dołożyła starań o aktualizację literatury, bo w zestawieniu uwzględniła publikacje z ostatnich lat. Niemniej strona edycyjna wymagałaby pewnych korekt, szczególnie dotyczących interpunkcji, np. braku przecinka po nazwie czasopisma (Brady, Chen, Gawkowska, Guo, Huisman, etc.), czy po numerze tomu (Abinandan).

Niezależnie od umieszczonych w recenzji uwag, komentarzy i pytań, jakość zaprezentowanych badań i strona merytoryczna rozprawy są bez wątpienia wysokie i zasługują na docenienie.

W związku z tym, że dwie z trzech prac przeszły niepodważalne procedury oceny recenzentkiej w renomowanych czasopism o zasięgu międzynarodowym, pozwolę sobie wyłącznie na krótki komentarz podsumowujący te publikacje.

Praca przeglądowa (P.1) zawarta jest na 23 stronach i zawiera 135 pozycji literatury. Została wzbogacona 4 rycinami i 4 tabelami. W pracy dokonano charakterystyki EPS oraz opisano wpływ różnych czynników na hodowlę mikroalg, np. światło, temperaturę, fazę wzrostu, system uprawy. Uwzględniono również rolę pierwiastków takich, jak azot, fosfor, węgiel, metale typu Cd, Co i Cr oraz pH. Opisano EPS jako wydajne flokulanty oraz przedstawiono trzy mechanizmy związane z procesem flokulacji, które ubogacono czterema rycinami. Omówiono również pojęcia bioflokulacji i autoflokulacji.

Praca eksperymentalna (P.2) mieści się na 15 stronach i bazuje na 51 pozycjach literatury. Znalazły się w niej dwie ryciny i sześć tabel. Celem tej pracy było przeprowadzenie charakterystyki biochemicznej rozpuszczalnej frakcji EPS syntetyzowanej przez mikroalgi, *P. kessleri* i *C. vulgaris* oraz jej właściwości sorpcyjne w stosunku do dwóch metali, Cd i Pb (w czterech stężeniach). W pracy przedstawiono sposób izolacji i określania wydajności syntezy EPS oraz składu biochemicznego – zawartości cukrów, kwasów uronowych, aminokwasów, monosacharydów i składu pierwiastków (Ca, Mg, Mn, P, S, Zn). Zastosowano techniki ICP-OES oraz FTIR-ATR. Wykazano, że głównymi składnikami EPS są węglowodany. EPS





syntetyzowany przez *C. vulgaris* miał mniejszą zawartość węglowodanów, ale charakteryzował się wyższą zawartością cukrów zredukowanych, kwasów uronowych, białek, aminokwasów i aminocukrów. Ksyloza produkowana była wyłącznie przez *P. kessleri*. Polimer produkowany przez *C. vulgaris* wykazywał wyższą pojemność sorpcyjną niż EPS uzyskany z *P. kessleri*. Wykazano, że *C. vulgaris* ma potencjał jako biosorbent w wodzie i w bioremediacji.

Reasumując, postawione cele zostały zrealizowane dzięki zastosowaniu właściwego podejścia metodologicznego. Określono warunki syntezy. Wykazano, że optymalne wyniki uzyskuje się przy  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  azotanu sodu. Niskie natężenie światła ogranicza produkcję EPS w porównaniu z wyższymi natężeniami. Określono skład chemiczny i właściwości EPS wytwarzanych przez wybrane jednokomórkowe glony. Stwierdzono przeważającą obecność cukrów. Miksotroficzne warunki wzrostu zwiększają wydajność i specyficzną produktywność EPS badanych gatunków glonów. Udało się potwierdzić występowanie określonych grup w EPS (grupy karboksylowe, hydroksylowe, fosforanowe i siarczanowe). Najwyższą pojemnością sorpcyjną wobec jonów Pb charakteryzowały się EPS wytwarzane przez *C. vulgaris* w warunkach auto- i miksotroficznych, choć efektywną syntezę prowadziły też glony *P. kessleri* w warunkach miksotroficznych. Najwyższą aktywność flokulacyjną demonstrują EPS syntetyzowane przez *C. vulgaris* i *V. magna*.

Należy podkreślić innowacyjne aspekty badań zaprezentowane w przedłożonej rozprawie. Po raz pierwszy opisano skład chemiczny EPS syntetyzowanych przez *V. magna*. Po raz pierwszy dokonano analizy zawartości aminokwasów i aminocukrów w EPS produkowanych pod wpływem różnych warunków natężenia światła. Ponadto, po raz pierwszy dokonano porównania poziomu syntezy EPS przez hodowle *V. magna* prowadzone w warunkach auto- i miksotroficznych. Osiągnięcia te świadczą o ponadprzeciętnym wkładzie Doktorantki w aktualny stan wiedzy na temat EPS pochodzących z jednokomórkowych glonów.



**Wniosek końcowy**

Rozprawa doktorska mgr Wiolety Ciempiel spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742). Wnoszę o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania doktorskiego i do publicznej obrony.

Rozprawa doktorska Pani mgr Wiolety Ciempiel stanowi wartościowe pod względem naukowym opracowanie, które w znacznym stopniu poszerza naszą wiedzę o EPS wytwarzanych przez glony jednokomórkowe, szczególnie zaś *V. magna*. Na tej podstawie wnoszę wniosek o wyróżnienie Doktorantki stosowną nagrodą.

*Agnieszka Hanaka*  
Dr hab. Agnieszka Hanaka, prof. ucz.

