



dr hab. Radosław Pankiewicz, prof. UAM

Poznań, 20.03.2023 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr Emilii Niemczyk

pt.: „**Ukierunkowana biosynteza i wybrane aspekty aktywności biologicznej fikobiliprotein**”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Lipoka
w Katedrze Farmacji i Chemii Ekologicznej,
na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego.

Fikobiliproteiny są głównym białkiem produkowanym przez cyjanobakterie zwane też sinicami. Są to autotroficzne, fotosyntezujące organizmy kojarzone powszechnie z zakwitami, czyli masowymi pojawami biomasy w wodach śródlądowych i morskich. Część gatunków tych bakterii może wydzielać do środowiska niebezpieczne dla ludzi i zwierząt toksyny. Stąd, w społeczeństwie dominuje raczej negatywny stereotyp sinic jako organizmów tylko i wyłącznie szkodliwych. Faktycznie często, szczególnie w czasie masowych pojawów, są niepożądanym składnikiem biocenozy, lecz w wielu przypadkach ta biomasa nadaje się do praktycznego wykorzystania. Cyjanobakterie znajdują zastosowanie jako biologiczny nawóz do wzbogacania gleby w związki azotowe podnosząc w sposób znaczący plony. Od lat, coraz większe znaczenie zdobywa „główny produkt” sinic czyli fikobiliproteiny. Są to związki chemiczne chętnie, ze względu na swoją barwę i właściwości przeciwutleniające, stosowane jako dodatki do żywności i kosmetyków. Stosowane są również w medycynie jako znaczniki w technikach immunofluorescencyjnych. Ze względu na szerokie i intensywne wykorzystanie fikobiliprotein niezbędnym stało się dokładne poznanie wpływu różnych czynników środowiskowych na rozwój poszczególnych gatunków wspomnianych organizmów.



Potrzeba ta znalazła praktyczne odzwierciedlenie w sformułowanym przez Panią mgr Emilię Niemczyk celu badań, będącym podstawą ocenianej rozprawy, którą zatytułowała – „Ukierunkowana biosynteza i wybrane aspekty aktywności biologicznej fikobiliprotein”.

Oceniana praca, realizowana pod kierunkiem profesora Jacka Lipoka, w całości podejmuje tematykę realizowaną w Katedrze Farmacji i Chemii Ekologicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego. Tytuł rozprawy został trafnie sformułowany i właściwie oddaje jej treść. Dysertacja licząca w całości 190 stron podzielona została zwyczajowo na główne części: cel pracy, przegląd literaturowy, metodologię prowadzonych badań, omówienie i dyskusję wyników, podsumowanie oraz wnioski. Przedstawiony podział pracy jest właściwy, a wyodrębnione podsumowanie, a także bardzo zwięzłe i przejrzyste wypunktowane wnioski zasługują na dodatkowe uznanie. Ponadto do pracy dołączony jest obszerny suplement zawierający szczegółowe informacje dotyczące gatunków organizmów wykorzystywanych w pracy, składu stosowanych pożywek, krzywe wzorcowe oraz dodatkowe wykresy zawierające dane, które autorka postanowiła przenieść z głównej części rozprawy. Bardzo ciekawym rozwiązaniem okazał się dodatkowy suplement załączony na osobnej, zalaminowanej kartce zawierający nazwy i wzory chemiczne wykorzystywanych w pracy związków, nazwy mikroorganizmów i rozwinięcie stosowanych przez autorkę skrótowców. Przyznaję, dodatek ten ułatwił dokładną lekturę tekstu.

Zasługującym na wyszczególnienie końcowym elementem pracy jest podsumowanie bogatej działalności naukowej Doktorantki. Składają się na nie licznie odbyte szkolenia; udział w trzech projektach badawczych; 22 komunikaty konferencyjne, w tym 13 ustnych; stypendia oraz 7 publikacji naukowych w tym 3 z listy Filadelfijskiej o wysokim IF. Jest to bardzo dobry wynik, jak na młodego naukowca, szczególnie jeśli chodzi o aktywność konferencyjną. Dodatkowo, wrażenie robi bardzo bogata działalność popularyzatorska i organizacyjna. Cieszy fakt, że tak wysoka aktywność na wielu polach została doceniona poprzez przyznanie Pani mgr Emilii Niemczyk licznych stypendiów i nagród.

Część teoretyczna pracy opisana została z uwzględnieniem dobrze dobranych pozycji literaturowych, przez co jej lektura stanowi właściwe wprowadzenie do tematyki badań

podjętych w pracy. W ramach tego, dosyć zwięźle opisanego rozdziału, czytelnik zostaje zapoznany z podstawowymi informacjami potrzebnymi do zrozumienia części badawczej dysertacji. Jest to moim zdaniem właściwe podejście, ponieważ dzięki temu tematyka przeglądu nie wykracza poza treść prowadzonych badań, a jest przygotowana rzetelnie i mocno podparta literaturą fachową, aż 336 pozycji (część z nich odnosi się do dyskusji wyników). Autorce prawie udało się ustrzec od błędów, nawet tych drobnych edytorskich, co zasługuje na pochwałę. Takie drobnostki jak pojawiające się na stronie 26 „nanocząsteczki srebra”, będące ewidentnie błędem edytorskim można pominąć. Zaintrygowała mnie natomiast informacja znajdująca się na stronie 27: „...stratosferyczna warstwa ozonowa chroniąca przed promieniowaniem UV ulega ciągłemu uszczupleniu...”. Na szczęście informacja ta powtórzona jest za dosyć starymi źródłami z lat 1998-2001, kiedy to mieliśmy apogeum tzw. „dziury ozonowej”. Na szczęście, dzięki realizacji działań podjętych w ramach protokołu montrealskiego, światowemu ograniczeniu produkcji freonów i innych związków zubożających warstwę ozonową, sytuacja od dwóch dekad wolno, ale nieustannie ulega poprawie. Warto o tym pamiętać, bo jest to dobry przykład pozytywnych efektów wspólnych wysiłków na rzecz naszej planety.

Następna część pracy, licząca 19 stron, zawiera metodologię prowadzonych badań, spis stosowanych związków chemicznych wraz z ich wzorami, opis wykorzystywanych mikroorganizmów, szczegółowe opisy przygotowania oraz prowadzenia hodowli eksperymentalnych. Opisanie są też procedury przeprowadzonych analiz. Dział ten został przygotowany starannie i zawiera wszystkie istotne informacje, które powinny się tam znaleźć. Wyłącznie z obowiązku recenzenta, wypomnę w tym miejscu, literówkę - błąd w skrótowcu DPPH na stronie 56.

Najbardziej obszernym elementem ocenianej dysertacji jest rozdział pod tytułem „Omówienie i dyskusja wyników”, który na 87 stronach, zawiera zestawienie wszystkich otrzymanych wyników wraz z ich dyskusją. Podzielony on został na podrozdziały, w których przedstawione są poszczególne aspekty badań dotyczących kolejno:

- wpływu fosfonianów i organicznych związków boru na zawartość barwników asymilacyjnych sinic,
- wpływu wybranych czynników chemicznych na zmianę statusu energetycznego komórek *A. platensis*,
- hodowli z wykorzystaniem fotobioreaktora,
- charakterystyki fizyko-chemicznej roztworów fikobiliprotein oraz ich aktywności biologicznej,
- wpływu wybranych modulatorów chemicznych i fizycznych na aktywność fikobiliprotein,
- interakcji fikobiliprotein z jonami złota.

Dobór i zakres przeprowadzonych badań jest właściwy i stanowi spójną całość. To krótkie stwierdzenie nie oddaje liczby eksperymentów, które zostały przeprowadzone oraz ilości przedstawionych i omówionych wyników. Wystarczy wspomnieć, że tylko w tej części pracy zawartych jest aż 76 rysunków, często wieloczęściowych. Praktycznie każdy z nich wart jest dłuższego pochylenia się nad nim i spokojnego przestudiowania zawartych tam danych.

Niemniej, nie umniejszając wartości pracy, w trakcie przygotowywania niniejszej recenzji, nasunęło mi się kilka pytań i uwag, którymi chciałbym się poniżej podzielić.

Tak jak wspomniałem, wiele rysunków jest bardzo złożonych i bogatych w informacje, dlatego autorka użyła w wielu miejscach bardzo małej czcionki (np. na stronie 60), co często utrudnia lub po prostu spowalnia odczytywanie danych. Praca napisana jest bardzo starannym językiem, jednak czasami pojawiają się określenia żargonowe, np. na stronie 77: „znaczny spadek chlorofili”. Na mapach termicznych strony 79 i 80 w podpisie powinny być wymienione, choćby skrótownicem, nazwy związków F1-F4. Przyznaję, że dołączony suplement jest bardzo przydatny, ale dodanie takich informacji podniosło by czytelność samego rysunku. Analizując dalej wspomniane mapy termiczne, zaciekało mnie dlaczego prezentacja wyników rozpoczyna się od związku F2, a nie od F1? Samo wykorzystanie krótkich oznaczeń typu F1 i B1 powtarza się często w opisach grafiki, to nie jest błąd, ale



moim zdaniem warto w takich miejscach podać nazwę związku, by tak bogate w informacje rysunki, mogły funkcjonować samodzielnie, nawet poza pracą.

Na stronie 103 znajduje się stwierdzenie: „Gatunki słodkowodne charakteryzowały się dużo niższą niż halofilne wrażliwością, wobec związków fosfonowych i boronowych”. Odniosłem inne wrażenie, wydaje mi się, że gatunki słodkowodne były w tych badaniach bardziej wrażliwe od halofilnych, szczególnie jeśli chodzi o negatywne skutki, a zwłaszcza o dodatek glifozatu, glifozyny, ATMP, kwasu fenyloboronowego, benzoksaborolu i 5-fluoro benzoksaborolu. Czy można w jakiś sposób ująć liczbowo tę „grupową” zależność? Czy jest możliwe ogólne wytłumaczenie różnic wrażliwości pomiędzy tymi grupami cyjanobakterii, czy jest to, po prostu efekt doboru konkretnych gatunków?

Na chromatogramie przedstawionym na stronie 104 warto opisać sygnały, tak aby jednoznacznie wynikało od której zasady pochodzą (ATP, ADP, AMP). W dodatku na stronie 49 pojawia się informacja, że rozdziały chromatograficzne zostały wykonane przy „izokratycznym przepływie fazy ruchomej”, natomiast na rysunku 61 w czasie 10-15 min i 20-25 min mamy przepływ gradientowy, co koreluje ze zmianami szybkości przepływu fazy ruchomej. Moim zdaniem właściwy rozdział dokonał się do 10 minuty, a dalej następuje procedura płukania kolumny i przygotowania jej do następnego nastrzyku. Proszę o ew. potwierdzenie moich domysłów.

Na stronie 110 znajduje się ciekawy wykres nr 68A. Pokazuje on zawartość, w trakcie trwania eksperymentu, fikobiliprotein w komórkach sinic w zależności od użytego do naświetlania światła - czerwonego, żółtego, niebieskiego i mieszanego (7 dni czerwone, a następnie 7 dni niebieskie światło). Eksperyment prowadzony ze światłem mieszanym, do pewnego momentu (siódmego dnia), jest w zasadzie eksperymentem z naświetlaniem światłem czerwonym. Należało by się spodziewać zatem, że siódmego dnia ilość fikobiliprotein w komórkach *A. platensis* powinna być podobna. Tymczasem w 7 dniu eksperymentu ze światłem czerwonym zawartość tych białek spadła, a ze światłem mieszanym (do tego momentu – również czerwonym) wyraźnie wzrosła. Proszę o wyjaśnienie tego paradoksu.



Podziwiając ogrom pracy włożony przez autorkę w przeprowadzenie wszystkich opisanych badań pojawia się przekornie pytanie czy można by sprawdzić coś jeszcze? Stąd, czy myślała Pani o połączeniu dwóch modulatorów zwiększających oddzielnie zawartość fikobiliprotein w badanych mikroorganizmach – B2 (benzoksaborolu) i światła niebieskiego?

Część merytoryczną rozprawy zamyka rozbudowane podsumowanie oraz wnioski przedstawione przejrzysto w punktach. Dalej znajduje się streszczenie pracy w języku angielskim, spis literatury, dorobku naukowego, rysunków, tabel i suplement.

Podsumowując, w swojej ocenie pracy doktorskiej Pani mgr Emilii Niemczyk stwierdzam, że doktorantka w przemyślany sposób oraz przy wykorzystaniu odpowiedniego warsztatu badawczego rozwiązała postawione w celu pracy problemy badawcze. Udało się jej, m.in. określić wpływ różnych modulatorów chemicznych i fizycznych na kondycję badanych cyjanobakterii oraz na ilość i rodzaj produkowanych fikobiliprotein. Pomyślnie ustaliła również, że stosowane modulatory mają wpływ na strukturę 2-rzędową badanych białek. Co ważne, zmodyfikowane w ten sposób białka (dodane w pożywce) okazały się mieć różny wpływ na inne organizmy, takie jak grzyby i eukariotyczne algi. Ważnym osiągnięciem praktycznym jest udana próba przeniesienia części eksperymentów ze skali laboratoryjnej na półpilotażową, co w przyszłości może umożliwić przemysłowe wykorzystanie otrzymanych, w ramach ocenianej pracy, wyników.

Biorąc pod uwagę wartość naukową zaprezentowanej przez Panią mgr Emilię Niemczyk rozprawy doktorskiej pt.: „Ukierunkowana biosynteza i wybrane aspekty aktywności biologicznej fikobiliprotein” stwierdzam, że spełnia ona prawne wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z przepisami art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), jak również stosowne zapisy ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668).

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego o dopuszczenie Pani mgr Emilii Niemczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Ponadto, mając na uwadze bardzo szeroki zakres i nowatorstwo przeprowadzonych badań oraz jakość uzyskanych wyników, wnioskuję do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej zgodnie z zasadami przyjętymi na Uniwersytecie Opolskim.