

Lublin, 30.09. 2024 r.

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

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Marcina Nędzy

pt. " Toksyczne oddziaływanie imidazoliowych cieczy jonowych na mikroglony i sinice bałtyckie" zrealizowanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Adama Latały w Katedrze Funkcjonowania Ekosystemów Morskich Uniwersytetu Gdańskiego

Podstawą wykonania opinii jest pismo prof. dr hab. Wojciecha Tylmanna, przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i środowisku.

Ocena formalna

Przedstawioną do oceny pracę doktorską mgr Marcina Nędzy stanowi cykl pięciu oryginalnych, spójnych tematycznie, wielo-autorskich prac, które są wynikiem współpracy pomiędzy Instytutem Oceanografii a Wydziałem Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W trzech pracach pan mgr M. Nędzy jest drugim, w jednej pracy pierwszym i w jednej publikacji trzecim autorem. Prace powstały w latach 2005-2013, w tym, w okresie studiów doktoranckich (2002-2007) na Uniwersytecie Gdańskim w zakresie Biologii i Oceanologii, opublikowana została tylko jedna praca, w której mgr M. Nędzy jest trzecim autorem. Publikacja, w której kandydat jest pierwszym autorem ukazała się w 2013 r. Fakt, że wniosek o nadanie stopnia doktora oparty jest na publikacjach sprzed 10-20 lat budzi zdziwienie recenzentki, gdyż nie wskazano przyczyny takiej sytuacji. Z informacji przedstawionych w załączniku do rozprawy doktorskiej nic nie wskazuje, aby kandydat po ukończeniu Środowiskowego Studium Doktoranckiego na Uniwersytecie Gdańskim zaangażowany był w pracę naukową, stąd pytanie o charakter udziału kandydata w pracach opublikowanych w latach 2009-2013. Publikacje wskazane jako podstawa do nadania stopnia doktora powstały

w ramach 2 projektów finansowanych przez KBN, wskazanych jako granty własne, oraz w ramach grantów przyznanych przez MNiSzW lub funduszy statutowych uczelni, uzyskanych przez współautorów publikacji. Publikacje ukazały się w międzynarodowych, wysoko punktowanych przez MNiSzW czasopismach takich jak *Aquatic Toxicology*, *Green Chemistry* i *Oceanological and Hydrobiological Studies*, o znaczących współczynnikach wpływu (IF) wskazanych w 2024 r. (od 0,9 do 9,8). Z oświadczeń współautorów (prof. A. Latały i prof. P. Stepnowskiego) wynika, że byli oni inicjatorami i autorami koncepcji badań, natomiast mgr M. Nędzi był w przeważającej części ich głównym wykonawcą. Prace będące podstawą wniosku o nadanie stopnia doktora dotyczą toksyczności imidazoliowych i pirydyniowych cieczy jonowych, stąd pytanie dlaczego tylko związki imidazoliowe zostały uwzględnione w tytule rozprawy mgr Marcina Nędzi.

Ocena merytoryczna

Cykl publikacji został opatrzony wstępem, w którym kandydat opisał dość ogólnie (na podstawie dostępnej współcześnie literatury) właściwości i zastosowania cieczy jonowych jako rozpuszczalników bardziej przyjaznych środowisku niż lotne rozpuszczalniki organiczne, w ramach rozwijania projektów tzw. "zielonej chemii". W czasie podejmowania problematyki przez zespół badawczy z udziałem mgr M. Nędzi, bardzo nieliczne dane oraz doniesienia dotyczyły cieczy jonowych oraz ich potencjalnego zagrożenia dla organizmów żywych, co stało się uzasadnieniem dla badań nad wpływem imidazoliowych cieczy jonowych dla mikroorganizmów morskich takich jak eukariotyczne mikroglony i sinice, będących jako producenci podstawą sieci troficznych Bałtyku. Ciecze jonowe jako efektywne nietlone sole o charakterze rozpuszczalników znajdują coraz szersze zastosowanie w różnych dziedzinach działalności człowieka, *i.e.* w przemyśle chemicznym, a obecnie także w medycynie i agrotechnice, ponieważ charakteryzują się szeroką gamą różnorodnych struktur chemicznych, które można projektować odpowiednio do pożądanych zastosowań. W okresie podejmowania badań nie istniały doniesienia o ewentualnych negatywnych skutkach przedostawania się ich do ekosystemów wodnych, w tym morskich oraz oddziaływania na organizmy je zasiedlające. W tym kontekście badania realizowane przez mgr Marcina Nędzi dotyczące toksyczności imidazoliowych i pirydyniowych cieczy jonowych względem fotosyntetyzujących mikroorganizmów Bałtyku miały nowatorski charakter. Zainteresowanie cieczami jonowymi jest aktualne i nadal rośnie, o czym świadczy

istotny wzrost liczby publikacji w obiegu światowym oraz znacząca liczba cytowań publikacji wchodzących w skład przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej (w sumie 760, stan na czerwiec 2024 r.) Interesującym pytaniem, w kontekście podjętych badań, jest uzasadnienie wyboru 13 konkretnych imidazoliowych i jednej pirydyniowej cieczy jonowych. Ponadto, czy w okresie podejmowania badań znane były ładunki lub stężenia tych związków w wodach powierzchniowych i czy brane były one pod uwagę przy wyborze zakresu stężeń zastosowanych w testach toksyczności? Czy znane są obecnie stężenia cieczy jonowych w ściekach z procesów przemysłowych, rolniczych, etc.?

Pan mgr Marcin Nędzi oprócz kopii 5 oryginalnych publikacji przedstawił w punkcie 4.2 wstępu do rozprawy "podstawowy cel badawczy" jakim było cyt. "pogłębione oszacowanie toksyczności cieczy jonowych na fotosyntetyzujące organizmy morskie" oraz pięć celów cząstkowych sformułowanych w postaci pytań, z których pytanie 5 "czy występuje bioakumulacja ILs w łańcuchu troficznym" wyszło poza cel podstawowy, gdyż badania dotyczyły bezkręgowców morskich: małży i pąkli bałtyckich. Również z tytułu rozprawy nie można wnioskować o poszerzonej tematyce badawczej w niej przedstawionej. Jednak podjęcie zagadnienia bioakumulacji w różnych, innych niż glony, elementach morskich łańcuchów troficznych uważam za interesujące i wartościowe. Postawione cele badawcze miały być osiągnięte po zweryfikowaniu prawidłowo zarysowanych hipotez badawczych. Kandydat określił następujące hipotezy badawcze : 1. ciecze jonowe mogą wywierać toksyczny wpływ na organizmy morskie; 2. toksyczność cieczy jonowych zależy od budowy chemicznej (m. in. długość łańcucha alkilowego i charakteru anionu); 3. wrażliwość fotosyntetyzujących organizmów morskich na ciecze jonowe jest odmienna u różnych taksonów (zielenice, okrzemki, sinice); 4. zasolenie może modyfikować toksyczność cieczy jonowych; 5. ciecze jonowe zdolne są do bioakumulowania się w łańcuchach troficznych organizmów morskich. Zdaniem recenzenta hipotezy badawcze są sformułowane zbyt ogólnikowo, ze względu na brak wskazania jakich organizmów dotyczą, a jak wiadomo, różne grupy systematyczne i ekologiczne organizmów morskich mogą reagować na konkretne związki w odmienny sposób. Hipotezy przedstawione w punkcie 4.3 Wstępu do cyklu prac niezupełnie pokrywają się z celami szczegółowymi przedstawionymi w p. 4.2. Jednakże w publikacji nr III z 2009 zarysowano hipotezę, że mikroorganizmy bentosowe (okrzemki i sinice) mogą inaczej reagować na badane związki niż mikroorganizmy planktonowe.

Dla osiągnięcia założonych celów w czterech pracach opublikowanych w latach 2005-2010 stosowano metodę testów toksyczności, w których negatywne oddziaływanie cieczy o zróżnicowanej strukturze chemicznej na wybrane taksony zielenic, okrzemek i sinic oceniano na podstawie zahamowania wzrostu hodowli szczepów pochodzących z Kolekcji Kultur Glonów Bałtyckich Uniwersytetu Gdańskiego oraz wyznaczania parametru toksyczności EC50 po określonym czasie ekspozycji (72 godz.). Jak dotąd, prace te należą do nielicznych dotyczących zagrożenia środowiska morskiego, w szczególności producentów pierwotnych jakimi są glony.

Uzyskane wyniki, które wskazują na zróżnicowaną toksyczność badanych cieczy jonowych na fotosyntetyzujące mikroorganizmy wodne, należące zarówno do fitoplanktonu jak i fitobentosu, są wartościowe i w istotny sposób poszerzyły stan wiedzy w zakresie potencjalnych zagrożeń związanych z ich przenikaniem do wód powierzchniowych. Mogą one znaleźć zastosowanie przy ustalaniu najniższych dopuszczalnych stężeń w środowisku naturalnym, chociaż w Polsce jak dotąd związki takie nie podlegają oficjalnemu monitoringowi. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono również, że stężenie, struktura chemiczna oraz długość łańcucha alkilowego jest decydująca dla toksyczności poszczególnych związków względem badanych mikroorganizmów, chociaż w przypadku sinic nie badano gatunków planktonowych. Ważnym wynikiem było stwierdzenie, że wzrost zasolenia środowiska wodnego powoduje znaczne zmniejszenie toksyczności zarówno względem przedstawicieli fitoplanktonu jak i fitobentosu. Czy można więc stwierdzić, że imidazoliowe sole są najbardziej niebezpieczne dla funkcjonowania producentów pierwotnych w wodach słodkich? Po raz pierwszy podjęte badania na wybranych bentosowych taksonach kolonijnych okrzemek (*Bacillaria paxillifer*) i sinic (*Geitlerinema amphibium*) wykazały, że toksyczny wpływ badanych cieczy zależy, tak jak w przypadku mikroorganizmów planktonowych, od stężenia i struktury cząsteczek imidazoliowych cieczy jonowych, przy czym związki bardziej lipofilowe, w przypadku organizmów bentosowych mogą być mniej szkodliwe ze względu na większą ich skłonność do adsorpcji na cząstkach osadów dennych. W związku z faktem, że badano cieczy jonowe należące do dwóch grup strukturalnych i.e. imidazoliowe i pirydyniowe i porównywano ich toksyczność względem mikroorganizmów wodnych funkcjonujących w różnych siedliskach, pożądanym byłoby wskazanie i porównanie ich pod względem lipofilowości ewentualnie hydrofilowości. Cechy te w przypadku organicznych zanieczyszczeń ekosystemów wodnych mają istotne znaczenie dla ich kumulowania się w komórkach i przenoszenia w łańcuchach pokarmowych.

Jednym z celów pracy było określenie cyt. „, czy wrażliwość fotosyntetyzujących organizmów z różnych grup taksonomicznych na toksyczny wpływ cieczy jonowych jest odmienna?” Zdaniem recenzentki, w świetle warunków prowadzenia eksperymentów nie można jednoznacznie porównywać wrażliwości poszczególnych taksonów na te same związki, ponieważ z przedstawionych informacji zamieszczanych w rozdziałach Materiały i metody wynika, że w testach toksyczności początkowa biomasa (inokulum) badanych mikroorganizmów nie była jednakowa na starcie eksperymentów wzrostowych. Czasem podawano gęstość początkową jako liczbę komórek w ml hodowli, a innym razem różne wartości gęstości optycznej (OD 665) inokulum, przy braku informacji dotyczącej odpowiadającej mu biomasy lub liczby komórek. Gęstość optyczna różnych hodowli zależy bowiem także od morfologii taksonów - niektóre były jednokomórkowe a inne wręcz tworzyły nitkowate kolonie, czasem posiadające śluzową otoczkę. Proporcje pomiędzy biomasa mikroorganizmu a stężeniem substancji toksycznej na starcie testów toksyczności rzutują na uzyskane wyniki. Już w pracy nr I z 2005 zaobserwowane silniejsze efekty toksyczne względem okrzemki *Cyclotella meneghiniana* niż względem zielenicy *Oocystis submarina*, wydają się być wynikiem prawie dwukrotnie niższego inokulum hodowli okrzemek niż zielenicy w prowadzonych testach. Nie podano także, czy w zastosowanej hodowli zielenica występowała w postaci pojedynczych komórek czy w postaci kolonii komórek zawieszonych w śluzowatej otoczce, co może mieć wpływ na reakcję komórek na toksyczny związek.

Pewnym niedociągnięciem metodycznym wymagającym wyjaśnienia jest generalny brak informacji na temat odczynu roztworów, w których prowadzono ekspozycję badanych mikroorganizmów. pH roztworów jest istotne dla wzrostu hodowli glonów i sinic. Czy wprowadzanie różnych stężeń badanych związków mogło mieć wpływ na odczyn roztworów i hodowli eksperymentalnych ?

Oprócz badań dotyczących toksyczności wybranych cieczy jonowych, na uwagę zasługuje podjęcie problemu kumulacji tych związków w elementach sieci troficznej ekosystemu Bałtyku i ich transferu pomiędzy producentami (glony) a konsumentami (filtratory: pąkle i małże) w eksperymentalnym, krótkim łańcuchu pokarmowym. Były to pierwsze badania dotyczące kumulacji soli jonowej w organizmach żywych, które wykazały (na podstawie wyznaczenia współczynników biokoncentracji), że zarówno glony (zielenica *Chlorella vulgaris*) jak i ich konsumenci mogą gromadzić imidazoliową sól jonową z otaczającej wody oraz że następuje przenoszenie tego związku w obrębie łańcucha

troficznego. Jednakże, ponieważ nie wskazano czy materiał biologiczny był płukany przed ekstrakcją i oznaczaniem stężenia badanego związku, nie można stwierdzić, czy mechanizm kumulacji polegał na wiązaniu powierzchniowym, czy również na wnikanii do wnętrza komórek i tkanek. Zdaniem recenzentki stężenia badanego związku powinny być raczej wyrażane w jednostkach masy na jednostkę objętości wody i jednostkę suchej masy w przypadku komórek glonów i tkanek zwierzęcych. Byłaby to bardziej przystępna forma dla czytelników, gdyż w zastosowanej formie należy poszukiwać masy cząsteczkowej soli jonowej, która nie została podana w rozdziale Materiały i metody odnośnej publikacji (nr V).

Stwierdzam, że wyniki badań przeprowadzonych przez mgr M. Nędzi a przedstawione w cyklu 5 współautorskich publikacji z lat 2005-2013 poszerzały znacząco stan wiedzy w zakresie oddziaływania wybranej grupy cieczy jonowych (głównie imidazoliowych) na wybrane taksony morskich organizmów (sinice, eukariotyczne glony i bezkręgowce). Posiadają one także wartość dla prac projektowych dotyczących syntezy nowych cieczy jonowych jak najbardziej bezpiecznych dla środowiska naturalnego.

Wymienione przez recenzentkę uwagi i niedociągnięcia w publikacjach nie przeważają nad wartością uzyskanych wyników, które nie straciły wiele ze swojej aktualności. Z tego względu rozprawę oceniam pozytywnie pod względem merytorycznym. Pod względem formalnym też została przygotowana zgodnie z obowiązującymi zasadami. Zdziwienie budzi jedynie tak późne przygotowanie rozprawy doktorskiej (11 lat po opublikowaniu ostatniej z prac), z czym recenzentka w swojej karierze naukowej dotychczas się nie spotkała.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marcina Nędzi spełnia wymogi zgodnie z art. 14 ust. 2 pkt 3 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 2 i 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669 z późn. zm.); § 7 ust. 1 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. poz. 261) i może stanowić podstawę do nadania stopnia naukowego doktora w dyscyplinie Nauki o Ziemi i środowisku.

B. Polik-Słodowicz