



Toruń, 04.05.2023

Dr hab. Agnieszka Kalwasińska, prof. UMK
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Jakuba Lacha

pt. „Charakterystyka bioróżnorodności i potencjału biotechnologicznego mikroorganizmów halofilnych”

Przedłożona do oceny praca doktorska Pana mgr Jakuba Lacha została wykonana w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Pawła Stączka, prof. Uniwersytetu Łódzkiego jako promotora oraz dr Agnieszki Matery-Witkiewicz z Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu jako promotora pomocniczego.

1. Uwagi ogólne i znaczenie podjętej tematyki badań

Problematyka badawcza omawianej rozprawy doktorskiej dotyczy aktualnej tematyki bioróżnorodności oraz oceny potencjału biotechnologicznego mikroorganizmów halofilnych pochodzących z solanek zlokalizowanych w południowej części Pogórza Karpackiego (m.in. z Kopalni Soli Bochnia) oraz tężni solankowych zlokalizowanych w Łodzi.

Doktorant podjął się trudnej, ale bardzo interesującej kwestii oceny bioróżnorodności oraz potencjału biotechnologicznego organizmów słonolubnych ukierunkowanego na właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

Badania nad mikroorganizmami środowisk skrajnych mają w głównej mierze swoje źródło w biotechnologicznym potencjale komórek tych organizmów. Ekstremofile, w tym halofile, dzięki naturalnym adaptacjom do skrajnych warunków, posiadają zdolność do produkcji różnorodnych enzymów hydrolitycznych, związków hamujących wzrost lub eliminujących patogeny,



wykazujących właściwości antynowotworowe, barwników, biosurfaktantów i bioplastików. Znalazienie zastosowania tych substancji w specyficznych warunkach, takich jak przemysł, medycyna, biologia molekularna i ochrona środowiska zostało już udokumentowane w licznych badaniach. Mimo nowych odkryć w grupie antybiotyków czy enzymów, zapotrzebowanie na nowe, bardziej odpowiednie dla specyficznych wymogów technologicznych oraz tańsze substancje pochodzenia biologicznego ciągle rośnie i pozostaje niezaspokojone. Dlatego uważam, że wszelkie próby podjęcia badań dotyczących poszukiwania nowych, obiecujących biotechnologicznie szczepów, przeszukiwanie informacji genetycznej tych szczepów, czy też genomów pochodzących np. z mikroorganizmów niehodowlanych pod kątem konkretnego potencjału o znaczeniu utylitarnym są bardzo cenne i potrzebne w nauce. **Tematyka pracy doktorskiej mgr Jakuba Lacha doskonale wpisuje się w ten nurt i ma znaczenie użytkowe, ponieważ jej wyniki mogą być wdrożone do praktyki.**

2. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska składa się z ciągu logicznie powiązanych ze sobą artykułów naukowych. **Cztery z nich zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych** a jedna z nich została wysłana do czasopisma i oczekuje na recenzje.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi pięć publikacji, z których pierwsza jest pracą przeglądową, natomiast pozostałe cztery są oryginalnymi pracami eksperymentalnymi. **Wszystkie publikacje zostały napisane przez Doktoranta jako pierwszego autora, co potwierdza jego znaczący wkład w powstanie tych prac.** Wraz z rozprawą doktorską zostały dołączone oświadczenia pozostałych autorów publikacji, potwierdzające wkład Doktoranta w ich powstanie.

Zbiór publikacji stanowi spójne omówienie wyników badań zawartych w następujących publikacjach:

1. **Lach J**, Jęcz P, Strapagiel D, Matera-Witkiewicz A, Stączek P. The Methods of Digging for "Gold" within the Salt: Characterization of Halophilic Prokaryotes and Identification of Their Valuable Biological Products Using Sequencing and Genome Mining Tools. *Genes* (Basel). 2021, 12(11):1756.



IF: 4.414, MEiN: 100 pkt.

2. **Lach J**, Królikowska K, Baranowska M, Krupińska M, Strapagiel D, Matera-Witkiewicz A, Stączek P. A first insight into the Polish Bochnia Salt Mine metagenome. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2023, 30(17):49551-49566.

IF: 5.190, MEiN: 100 pkt.

3. **Lach J**, Strapagiel D, Matera-Witkiewicz A, Stączek P. Draft genomes of halophilic *Chromohalobacter* and *Halomonas* strains isolated from brines of the Carpathian Foreland, Poland. *J Genomics.* 2023, 21;11:14-19.

MEiN: 100 pkt.

4. **Lach J**, Strapagiel D, Matera-Witkiewicz A, Stączek P. Draft genomes of halophilic Archaea strains isolated from brines of the Carpathian Foreland, Poland. *J Genomics.* 2023 Apr 10;11:20-25.

MEiN: 100 pkt.

5. **Lach J**, Krupińska M, Mikołajczyk A, Strapagiel D, Stączek P, Matera-Witkiewicz A. Novel AMP from saline environments – promising glimmer for inhibition of multidrug resistant *E. faecalis* and *S. aureus* infections. *Eur J Pharm Biopharm* 2023.

IF: 5.589, MEiN: 100 pkt.

Artykuły zawarte w dysertacji zostały opublikowane w ciągu lat 2021-2023, a ich sumaryczny Impact Factor, zgodnie z rokiem wydania, nie uwzględniając pracy jeszcze nie opublikowanej, wynosi **9.604**. Suma punktów według MEiN wynosi **400**, co jest bardzo dobrym wynikiem. **Te wskaźniki potwierdzają wysoki poziom badań przeprowadzonych przez Doktoranta oraz ich wartość dla nauki.**

Rozprawa doktorska ma prawidłową strukturę i składa się z następujących rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Omówienie wyników, Wnioski, Bibliografia, Streszczenie w języku polskim oraz Streszczenie w języku angielskim. Dysertacja została poprzedzona opracowaniem, które obejmuje Spis treści, Źródła finansowania i współpraca, Dorobek naukowy oraz Staże naukowe. Na końcu pracy umieszczono Załączniki obejmujące publikacje wchodzące w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów publikacji. Całość liczy 142 strony.



3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Tytuł przedstawionej rozprawy doktorskiej jest dokładny i odzwierciedla jej zawartość, a wyniki uzyskane w ramach badań są zgodne z postawionym celem.

Rozdział otwierający pracę doktorską zatytułowany Wstęp stanowi syntetyczny przegląd literatury w zakresie podjętej tematyki badawczej. Jest logiczny i spójny, zawiera niezbędne informacje konieczne do zrozumienia celu pracy i późniejszej interpretacji uzyskanych wyników.

Cel pracy, wraz z celami szczegółowymi, został sformułowany precyzyjnie, łącząc aspekt poznawczy i aplikacyjny. Aspekt poznawczy dotyczy bioróżnorodności mikrobioty środowisk słonych w kontekście składu taksonomicznego oraz bioróżnorodności związanej z potencjałem biotechnologicznym. Aspekt aplikacyjny z kolei dotyczy nowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych o potencjalnym zastosowaniu w walce z patogenami wielolekoopornymi.

Kolejny rozdział Rozprawy obejmuje opis materiałów oraz metod badawczych wykorzystanych w pracach eksperymentalnych. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz zastosowanych metod obejmujący zarówno metody hodowlane, metody biochemiczne, jak i najnowsze osiągnięcia biologii molekularnej wysokoprzepustowe sekwencjonowanie amplikonów genu 16SrRNA, sekwencjonowanie genomów oraz sekwencjonowanie metagenomów. Recenzowana rozprawa doktorska opiera się na szeroko zaplanowanych, kompleksowych badaniach. **Warta podkreślenia jest umiejętność wykonania przez Doktoranta obróbki bioinformatycznej danych po sekwencjonowaniu. Wymaga to nie lada umiejętności, znajomości obsługi wielu programów i narzędzi bioinformatycznych, cierpliwości i dokładności a także znacznego nakładu pracy.**

Do tej części Rozprawy doktorskiej mam jednak kilka krytycznych uwag:

1. Opis materiałów i metod jest zbyt lakoniczny. Należałoby uwzględnić w nim następujące kwestie:
 - charakterystykę podstawowych właściwości fizyko-chemicznych solanek tężni zlokalizowanych w Łodzi oraz, w tym źródła zasilającego tężnie; dla solanek pobranych w Bochni podaje Doktorant przynajmniej zasolenie mierzone



stężeniem NaCl oraz ich odczyn; solanek z ujęcia Barycz i Łapczyca w ogóle nie scharakteryzowano;

- dane dotyczące temperatury solanek zmierzonej w warunkach *in situ* - ten parametr środowiskowy bardzo mocno determinuje skład natywnej mikrobioty;
- informację o czasie inkubacji hodowli w celu pozyskania izolatów, liczbie pozyskanych izolatów, liczbie zsekwencjonowanych genomów oraz liczbie MAGs;
- nazwę kitu wykorzystanego do przygotowania bibliotek amplikonów genu 16SrRNA;
- sekwencję zastosowanych primerów w celu pozyskania amplikonów genu 16SrRNA;
- informacje dotyczące rodzaju obliczanych miar/wskaźników bioróżnorodności oraz programu wykorzystanego do tego celu;
- rodzaju zastosowanych metod ordynacyjnych oraz programu wykorzystanego do tego celu;
- informacji o metodach wykorzystanych do konstrukcji drzew filogenetycznych;
- informacji dotyczących spektrum lekooporności wykorzystanych patogenów;
- przyjętych kryteriach w ocenie cytotoksyczności i aktywności hemolitycznej; badanych peptydów.

2. Wątpliwość moją budzi prawidłowość stosowania przez Doktoranta terminu „kontig” podczas opisu próbkowania w zbiorze danych otrzymanym po sekwencjonowaniu amplikonów genu 16SrRNA. Raczej powszechnie stosowanym w takiej sytuacji terminem jest „odczyt” (w rozumieniu że jest on sparowany).

Chciałabym poprosić też Doktoranta o wyjaśnienie, dlaczego w badaniach dotyczących tężni solankowych jako źródło mikroorganizmów halofilnych oraz DNA metagenomowego wykorzystano gałązki tarniny a nie solankę zasilającą poszczególne tężnie?

Chciałabym również zapytać o powód stosowania filtracji w celu pozyskania izolatów mikroorganizmów słonolubnych. Czy podejmowano wcześniej próby hodowli z prób nie rozcieńczonej/rozcieńczonej solanki? Jeśli tak, jaki był rezultat?



W kolejnym rozdziale Omówienie wyników przedstawiono w skróconej formie rzeczowe omówienie wyników badań w kontekście postawionego celu. Brakuje mi tutaj zwięzłej dyskusji otrzymanych wyników w celu ich konfrontacji z doniesieniami innych naukowców. W tym kontekście chciałabym prosić Doktoranta o wyjaśnienie co czyni Kopalnię Soli Bochnia unikatowym środowiskiem bytowania mikroorganizmów słonolubnych i czy jego mikrobiom rzeczywiście można uznać za jedyny w swoim rodzaju, niepowtarzalny, czy wyjątkowy?

W Bibliografii Autor zamieścił 57 pozycji piśmiennictwa dobrane właściwie pod względem tematycznym. Pozycje z ostatnich 5 lat stanowią około 50% całego piśmiennictwa.

Podsumowując ocenę merytoryczną, stwierdzam, że Pan mgr Jakub Lach, mimo pewnych niedociągnięć w przygotowaniu opisu zastosowanych metod oraz dyskusji rezultatów prac eksperymentalnych, uzyskał wiele cennych wyników.

Przeprowadzone prace eksperymentalne prezentują oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego i dostarczają wielu istotnych informacji, które poszerzają wiedzę na temat bioróżnorodności i potencjału biotechnologicznego organizmów słonolubnych unikalnego środowiska ekstremalnego i mają potencjał dla dalszych badań w tej dziedzinie; natomiast praca przeglądowa znakomicie w prowadzi w najnowszej metodykę związaną z celem badań.

Dodatkowo na podkreślenie zasługuje aktywność naukowa Doktoranta. Pan mgr Jakub Lach, obok prac stanowiących podstawę pracy doktorskiej, jest współautorem 14 artykułów naukowych których sumaryczny Impact Factor wynosi **96.078** a suma punktów według MEiN wynosi **1610**. Jest również współautorem 17 komunikatów zjazdowych. Dodatkowo, realizował dwa staże naukowe, w tym jeden zagraniczny. **Taka aktywność świadczy o motywacji, zapale i zaangażowaniu w osiągnięcie celów związanych z uzyskaniem stopnia naukowego doktora oraz doskonale wróży dalszej karierze naukowej.**

3. Ocena końcowa

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską mgr Jakuba Lacha pod tytułem " **Charakterystyka bioróżnorodności i potencjału biotechnologicznego mikroorganizmów halofilnych**" jako



spełniającą kryteria stawiane pracy doktorskiej określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (tekst jednolity: Dz.U. z 2022 r. poz. 574 ze zm).

Pan Jakub Lach wykazał się teoretyczną wiedzą w zakresie mikrobiologii oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedstawił szeroki zakres metod badawczych stosowanych w mikrobiologii i biologii molekularnej oraz umiejętnie prezentował i interpretował w załączonych publikacjach naukowych wyniki swoich badań.

W świetle powyższych kwalifikacji, wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana Jakuba Lacha do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

A. Kalwasińska

dr hab. Agnieszka Kalwasińska, prof. UMK

Toruń, 04.05.23