

Gdańsk, 13.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Jakuba Lacha
pt.: „Charakterystyka bioróżnorodności i potencjału biotechnologicznego
mikroorganizmów halofilnych”

Przedłożona do recenzji praca doktorska została wykonana przez mgr. Jakuba Lacha w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr. hab. Pawła Stączka, prof. UŁ przy współdziałaniu dr Agnieszki Matera-Witkiewicz.

Przedmiotem rozprawy było scharakteryzowanie bioróżnorodności mikrobiomów wybranych środowisk o wysokim zasoleniu (Kopalnia Soli Bochnia, solanki pobrane na obszarze Pogórza Karpackiego) oraz ocena potencjału biotechnologicznego bytujących tam mikroorganizmów w oparciu o dane genomowe i metagenomiczne.

Podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie nauki biologiczne jest spójny tematycznie cykl 4 wieloautorskich prac (1 przeglądowa i 3 oryginalne, liczba współautorów od 4 do 7) opublikowanych w latach 2021 – 2023. Wszystkie prace zostały wydane w trybie „open access”, w czasopiśmie międzynarodowym o punktacji wg. wykazu ministerialnego 100 pkt., a w przypadku dwóch z nich również o wysokim współczynniku oddziaływania (*IF*): *Genes* (MDPI, *IF* 4,414) i *Environmental Sciences Pollution Research* (Springer, *IF* 5,190). Parametry naukowe świadczą o wysokim poziomie zrealizowanych badań. Pan mgr Jakub Lach włączył do cyklu prac również manuskrypt piątej publikacji, zgłoszonej do czasopisma *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, która w chwili składania pracy doktorskiej była w trakcie recenzji.

Liczba cytowań prac (bez autocytowań) jest niska i wynosi wg bazy *Web of Science* 4, ale od publikacji pierwszych wyników minęły niecałe dwa lata. Godnym podkreślenia jest fakt, że Doktorant we wszystkich pracach jest zarówno pierwszym jak i korespondencyjnym autorem (przy czym w dwóch publikacjach funkcję autora korespondencyjnego pełni również Promotor ocenianej pracy), co wskazuje na znaczny wkład Pana mgr. Jakuba Lacha w ich

powstanie oraz znajduje potwierdzenie w opisach udziału Autora w wykonanych badaniach zamieszczonych w recenzowanej rozprawie jak i oświadczeniach współautorów prac. Pan mgr Jakub Lach pełnił wiodącą rolę: w opracowaniu koncepcji prac, w przygotowaniu wstępnej jak i finalnej wersji manuskryptów, w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów, zajmował się przygotowaniem bibliotek DNA do sekwencjonowania metagenomów. Przeprowadził większość analiz bioinformatycznych i statystycznych (za wyjątkiem identyfikacji i charakterystyki AMPs).

Publikacje wchodzące w skład rozprawy poprzedzone są 40-stronnicowym opracowaniem zawierającym następujące rozdziały: źródła finansowania i współpraca, dorobek naukowy, staże naukowe, wstęp, cel pracy, materiały i metody, omówienie wyników, wnioski, bibliografia, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz załączniki zawierające pełne teksty publikacji będących podstawą ubiegania się o stopień doktora wraz z oświadczeniami o roli współautorów przy ich powstawaniu.

We wstępie Doktorant przedstawia środowiska zasolone, zarówno naturalne jak i powstałe przy udziale człowieka np. kopalnie soli kamiennej czy saliny. Następnie opisuje mikroorganizmy bytujące w tego typu środowiskach (halofile, halotoleranty) oraz mechanizmy umożliwiające im przetrwanie w takich warunkach. Tą część pracy kończy przedstawienie znaczenia halofili w przemyśle biotechnologicznym. Wstęp jest napisany jasno i klarownie, w sposób zwięzły i wyczerpujący wprowadza w zagadnienia związane z tematyką pracy doktorskiej. Następnie Doktorant przedstawił cel pracy, w którym określił w zwięzły i jasny sposób zamierzenia badawcze, tj. scharakteryzowanie bioróżnorodności mikrobiomu Kopalni Soli Bochnia oraz zsekwencjonowanie i scharakteryzowanie genomów szczepów mikroorganizmów wyizolowanych z solanek pobranych na obszarze Pogórza Karpackiego.

W pierwszej publikacji Pan mgr Jakub Lach dokonał przeglądu strategii eksperymentalnych wykorzystywanych do identyfikacji nowych bioproduktów mikroorganizmów, które mogą być wykorzystane do badań nad mikroorganizmami halofilnymi. Szczególną uwagę zwrócił na metody wykorzystujące sekwencjonowanie kwasów nukleinowych oraz analizę danych, pozwalające na wysokowydajne i ukierunkowane poszukiwania genów i klastrów genów związanych z wytwarzaniem bioproduktów, a także przedstawił ich wady i zalety. Zwrócił również uwagę, że niezbędny jest rozwój baz danych

zawierających dobrze scharakteryzowane genomy mikroorganizmów halofilnych i metagenomy środowisk zasolonych do dalszego rozwoju metod analitycznych oraz identyfikacji nowych bioproduktów wytwarzanych przez organizmy halofilne, aby mogły być wykorzystane w przemyśle. Publikacja ta bardzo dobrze wprowadza czytelnika w realizowaną przez Doktoranta tematykę.

Przedmiotem drugiej publikacji były badania bioróżnorodności mikrobiomu Kopalni Soli Bochnia oraz ocena potencjału biotechnologicznego wchodzących w jego skład mikroorganizmów. Analizę prowadzono w oparciu o dane z sekwencjonowania ampliconów fragmentów genów kodujących 16S rRNA oraz wyniki sekwencjonowania metagenomów. Mimo występowania pewnych rozbieżności w wynikach sekwencjonowania metagenomów i ampliconów wykazano, że skład mikrobiomów poszczególnych stanowisk jest stabilny w czasie i że występują różnice w składzie mikrobiomów w zależności od poziomu kopalni. Odzyskano 16 unikatowych MAGs, z których 15 należało do nieznanymi gatunków. Ponadto zidentyfikowano w metagenomach liczne klastry genów związanych z biosyntezą wtórnych metabolitów takich jak terpeny, ektoina, siderofory, tiopeptydy czy lantipeptydy oraz geny kodujące peptydy przeciwdrobnoustrojowe.

W trzeciej i czwartej z prac wchodzących w skład cyklu przedstawiono badania sekwencjonowania i charakterystykę genomów odpowiednio pięciu szczepów halofilnych bakterii oraz trzech szczepów halofilnych Archaea wyizolowanych ze środowisk o wysokim zasoleniu z obszaru Podgórze Karpackiego. W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań trzy szczepy halofilnych bakterii (11-W, 296-RDG, 48-RD10) zostały przypisane do rodzaju *Chromohalobacter*, a dwa (11-S5, 25-S5) do rodzaju *Halomonas*. Szczepy 296-RDG i 48-RD10 klastrowały wspólnie i lokowały się najbliżej *Chromohalobacter canadensis*, a szczep 11-W był najbliższy gatunkowi *Chromohalobacter sarecensis*. Z kolei szczepy 11-S5 i 25-S5 utworzyły wspólny klaster i ulokowały się najbliżej *Halomonas sediminicola*. Szczepy halofilnych Archaea zostały przypisane odpowiednio: Boch-4 do gatunku *Haloarcula hispanica*, szczep Boch-26 do rodzaju *Halorubrum*, a szczep POP-27 do rodzaju *Halopenitus*.

Doktorant załączył również manuskrypt piątej, zgłoszonej do wydawnictwa pracy ale nie została ona jeszcze przyjęta do druku i nie może być oceniana jako część cyklu prac będących podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora. Na podstawie zidentyfikowanych

w badanych próbkach, pobranych ze środowisk o wysokim zasoleniu, genów kodujących peptydy przeciwdrobnoustrojowe wyselekcjonowano trzy sekwencje, przeprowadzono ich syntezę i zbadano ich aktywność wobec wybranych lekoopornych patogenów. Tylko dwa spośród badanych związków (P1 i P3) wykazywały działanie przeciwbakteryjne (P1 wobec *E. faecalis* - MIC₅₀ = 32µg/ml; P3 wobec *E. faecalis* i *S. aureus* - MIC₅₀ = 32µg/ml) ale wyniki nie są zbyt optymistyczne. Uzasadnienia wymaga dobór antybiotyków (gentamycyna, lewofloksacyna) użytych do modelowania, których działanie jest uzależnione od wnikięcia leku do wnętrza komórki bakteryjnej. Na podstawie jakich danych Doktorant przyjął, że peptydy P1 i P3 będą wnikały do komórki a nie będą np. dezintegrować błony bakteryjnej lub zaburzać syntezy ściany komórkowej, które są popularnymi celami AMPs. Zaletą otrzymanych związków jest brak aktywności hemolitycznej i cytotoksyczności wobec badanej linii komórkowej.

Pracę doktorską mgr. Jakuba Lacha przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Błędy czy usterki edycyjne są nieliczne. Z obowiązku recenzenta poniżej wymieniam przykładowe z nich:

- stosowanie czasami kropek zamiast przecinków przy zapisie ułamków dziesiętnych (np. str. 5-8),
- używanie niefortunnych określeń: „potencjałem objawiającym się” (str. 30) czy „na drzewie filogenetycznym stworzonym” (str. 26).

Na podkreślenie zasługuje duża aktywność naukowa mgr. Jakuba Lacha, który jest współautorem 18 publikacji w czasopiśmie o sumarycznym IF ok. 109,7 i punktacji wg wykazu ministerialnego 2010 (przy czym w 4 pracach jest pierwszym autorem i stanowią one cykl prac będących podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora). Ponadto wyniki swoich prac prezentował szeroko na konferencjach krajowych i międzynarodowych w formie 17 doniesień (w ocenianych materiałach brak informacji o typie prezentacji), uczestniczył w dwóch stażach, w tym 1 zagranicznym.

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że praca zawiera istotne elementy nowości naukowej: po raz pierwszy zobrazowano skład taksonomiczny mikrobiomu Kopalni Soli Bochnia oraz w oparciu o dane metagenomiczne wykazano, potencjał biotechnologiczny

bytujących tam mikroorganizmów, o czym świadczyła obecność w ich genomach klastrów genów związanych z biosyntezą wtórnych metabolitów, ponadto scharakteryzowano genomy ośmiu szczepów mikroorganizmów halofilnych wyizolowanych ze środowisk o wysokim zasoleniu z obszaru Podgórze Karpackiego.

Z pełnym przekonaniem uznaję, że oceniana przeze mnie praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do ustawy – tekst jednolity: Dz. U. 2023 r. poz. 742) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne o dopuszczenie Pana mgr. Jakuba Lacha do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo duży wkład włożony w przygotowanie pracy, zakres i jakość przeprowadzonych badań oraz wartość wyników zawartych w recenzowanej pracy, a także wyjątkowo dużą aktywność publikacyjną Doktoranta wnioskuję o wyróżnienie.

Pan mgr Jakub Lach wg załączonych oświadczeń uczestniczył we wszystkich etapach pracy naukowej, począwszy od wiodącej roli przy opracowaniu koncepcji, poprzez przygotowania bibliotek DNA do sekwencjonowania metagenomów, przeprowadzanie analiz bioinformatycznych i statystycznych aż po przygotowanie ostatecznych wersji manuskryptów i przygotowywanie odpowiedzi na opinie recenzentów. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora zostały przedstawione w 4 publikacjach (w tym 2 z listy JCR, sumaryczny IF 9,6) o łącznej liczbie punktów 400 wg wykazu ministerialnego czasopism, w których był pierwszym i korespondencyjnym autorem, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu się do badań (jedna z prac z listy JCR była przeglądowa i została wydana przed rozpoczęciem części doświadczalnej), jakości przeprowadzonych eksperymentów oraz zaangażowaniu w ich realizację Doktoranta. Wydane publikacje niewątpliwie wnoszą istotne elementy nowości dotyczące nie tylko bioróżnorodności badanych środowisk ale również identyfikacji klastrów genów związanych z biosyntezą wtórnych metabolitów oraz sekwencji kodujących peptydy przeciwdrobnoustrojowe do wiedzy o mikrobiomie środowisk o wysokim zasoleniu. Ponadto uzyskane ze złożonych metagenomów informacje o genach kodujących sekwencje peptydy przeciwdrobnoustrojowe mają nie tylko walory poznawcze, co przedstawiono w ocenianym

osiągnięciu ale mogą posiadać również potencjał aplikacyjny, co sugeruje załączony manuskrypt o AMPs, przy czym te aspekty wymagają jeszcze dalszych badań.

Godnym podkreślenia jest fakt, że mgr Jakub Lach równoległe z przygotowaniem pracy doktorskiej wyjątkowo aktywnie angażował się w inne badania efektem, których są liczne prace (14) w czasopismach z listy JCR o punktacji ministerialnej od 100 do 200 punktów, co bardzo dobrze rokuje dla Jego dalszej kariery naukowej.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej


prof. dr hab. Wojciech Kamysz