

Dr hab. Alicja Węgrzyn, prof. PAN

Gdańsk 20 stycznia 2021 r.

Pracownia Biologii Molekularnej

Instytut Biochemii i Biofizyki

Polskiej Akademii Nauk

**Recenzja osiągnięć naukowych Pani Doktor Agnieszki Kalwasińskiej
w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych.**

Przedstawioną ocenę wykonałam na zlecenie Przewodniczącego Rady Dyscypliny Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Pana dr hab. Dariusza Smolińskiego. Swoją opinię przedstawiam na podstawie dostarczonych mi dokumentów, w szczególności: autoreferatu, osiągnięcia naukowego przedłożonego w postaci zbioru sześciu publikacji, wykazu opublikowanych prac naukowych, informacji o pracy dydaktycznej, współpracy naukowej i popularyzacji nauki. Wszystkie dokumenty pod względem formalnym i edytorskim zostały przygotowane w sposób umożliwiający ocenę. Spis literatury wykorzystanej w powstaniu autoreferatu jest pokaźny i świadczy o znajomości tematu przez Panią Doktor Agnieszkę Kalwasińską

Ocena osiągnięcia naukowego

Jako osiągnięcie habilitacyjne Pani dr Agnieszka Kalwasińska przedstawiła cykl monotematycznych artykułów pt.: "Zbiorowiska bakteryjne i archeonowe ekstremalnych środowisk o różnym stopniu zasolenia", które powstały w oparciu o wyniki badań przeprowadzone w latach 2013-2018. Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład rozprawy wynosi 15,13 oraz 400 punktów MNiSW. Habilitantka we wszystkich artykułach jest pierwszą i korespondującą autorką. Artykuły zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach o IF od 0,750 do 5,589 w latach 2015-2020. Prace zostały zamieszczone w takich czasopismach jak: Polish Journal of Microbiology, Antonie Van

Leeuwenhoek, Food Technology and Biotechnology, Science of the Total Environment, Geomicrobiology Journal, and Applied and Environmental Microbiology. W związku z tym, że są to prace wieloautorskie Habilitantka opisała swój udział w powstaniu każdej z prac wchodzących w skład rozprawy. Pani dr Agnieszka Kalwasińska planowała doświadczenia, część z nich samodzielnie wykonała a mianowicie: oznaczanie ogólnej liczby mikroorganizmów, izolację bakterii, przeprowadziła testy fizjologiczno-biochemiczne izolatów, dobrała odpowiednie podłoża mikrobiologiczne do hodowli, zoptymalizowała metody oznaczania aktywności proteazy oraz przeprowadziła analizę statystyczną uzyskanych wyników, opracowała wyniki eksperymentów, pisała manuskrypty artykułów, przygotowywała odpowiedzi na pytania recenzentów, zatem odegrała wiodącą rolę w powstaniu prac wchodzących w skład osiągnięcia, co potwierdza lektura oświadczeń współautorów. Na podstawie opisu udziału poszczególnych autorów w tworzeniu artykułów stwierdzam, że Habilitantka zawsze wykonywała te same, podstawowe i bardzo proste eksperymenty. Doświadczenia takie jak, izolacja DNA do sekwencjonowania, wykonanie bibliotek metagenomowych, obróbka bioinformatyczna sekwencji, konstrukcja drzew filogenetycznych i zwyczajowo ich opis, identyfikacja molekularna szczepów, oczyszczanie enzymu i jego fizyko-chemiczna charakterystyka, wykonanie krzywych kalibracyjnych do oznaczenia poziomu enzymu i chociażby wykonanie elektroforezy SDS-PAGE, niestety nie były udziałem Habilitantki, lecz współautorów. Martwi mnie w tym miejscu skromny warsztat Habilitantki jeżeli chodzi o umiejętność posługiwania się technikami biologii molekularnej. Klasują się one raczej na poziomie technika czy diagnosty laboratoryjnego a nie doktora habilitowanego nauk biologicznych. Posiadanie bogatego warsztatu technik molekularnych zdecydowanie ułatwia kierowanie zespołem a przede wszystkim rozwiązywanie problemów technicznych pojawiających się podczas eksperymentalnej pracy.

Prace wchodzące w skład osiągnięcia zostały zacytowane łącznie 12 razy co pokazuje, iż temat jakim zajmuje się Habilitantka jest niszowy.

Celem pracy Habilitantki była charakterystyka ekstremalnych środowisk sztucznych i naturalnych pod względem bioróżnorodności i fizjologii mikroorganizmów oraz właściwości fizyko-chemicznych tych siedlisk, określenie potencjalnych możliwości izolowanych bakterii w przemyśle i ochronie środowiska. Jest to temat ciekawy i uzasadniony głównie z punktu widzenia poznawczego. Wystarczy sprawdzić ilość dostępnych artykułów w bazie PubMed na temat bakterii zasiedlających ekstremalne środowiska naturalne czy te będące wynikiem działalności gospodarczej człowieka, by przekonać się, że ukazuje się ich niewiele.

Dodatkowo bakterie bytujące w ekstremalnych siedliskach biorąc pod uwagę temperaturę, stężenie soli, pH podłoża, obecność metali ciężkich czy panujące ciśnienie posiadają z pewnością wiele wyspecjalizowanych enzymów czy metabolitów wtórnych umożliwiających im przetrwanie, które mogą być wykorzystane w przemyśle, biotechnologii czy medycynie. Połączenie w badaniach kwestii podstawowych oraz czysto poznawczych wraz z potencjalnym wykorzystaniem w gospodarce wydaje się być rozwiązaniem idealnym i wpisuje się w nurt łączenia nauki z biznesem.

Pani dr Agnieszka Kalwasińska postawiła w swoim autoreferacie pięć hipotez badawczych, niestety żadna z nich nie jest nowatorska czy zaskakująca, dla przykładu pierwsza hipoteza mówiąca o tym, że zasolenie jest ważnym czynnikiem ekologicznym kształtującym skład zbiorowisk mikroorganizmów i wraz ze wzrostem zasolenia dochodzi do spadku liczebności mikroorganizmów. Odpowiedzi na tę i inne hipotezy możemy znaleźć w literaturze tematu sprzed 20-30 lat.

Habilitantka prace badawcze rozpoczęła od eksploracji wapna posodowego składowanego w osadnikach ziemnych, powstałego podczas produkcji sody kalcynowej z solanki i wapienia w Janikowskich Zakładach Sodowych. Wapno to zawiera różne stężenie soli od 3 do 30 %, jest silnie alkaliczne (pH 11), ubogie w azot i węgiel organiczny a jego głównym składnikiem jest węgiel wapnia. Do badań Habilitantka wybrała próby o zasoleniu 2, 14, 24% pobierane z głębokości od 0,5 do 2 metrów co 0,5 m. Wierzchnia warstwa wapna podlegała wpływom warunków atmosferycznych w związku z tym warunki w niej panujące były zmienne, natomiast głębsze warstwy miały warunki ustabilizowane. Z przeprowadzonych badań Habilitantka wysnuła wniosek, że w wapnie o najwyższym stopniu zasolenia liczebność mikroorganizmów była istotnie niższa, niż w wapnie o niskim i średnim zasoleniu. Określono również liczbę mikroorganizmów w poszczególnych warstwach i wahała się ona od 10^5 do 10^8 komórek na gram suchej masy. Habilitantka określała liczbę bakterii we wszystkich pobieranych próbach posługując się tylko jedną metodą z roku 1977. Hodowla w warunkach laboratoryjnych bakterii z ekstremalnych środowisk nastęcza bardzo wielu trudności, jak wiadomo z literatury na sztucznych podłożach wyrasta około 2% bakterii obecnych w próbach a 98% jest traconych bez powrotnie. W celu uniknięcia tak ogromnych strat bakterie pobrane z ekstremalnego środowiska (np.: bakterie z mleka wapiennego obecnego w jaskiniach) wysiewa się na kilka a nawet kilkanaście selekcyjnych podłoży odpowiednio dobranych do różnych, spodziewanych rodzin bakterii. Habilitantka posługiwała się w pracy jednym typem podłoża i jedną metodą, stąd powstały moje

wątpliwości dotyczą wiarygodności otrzymanych rezultatów a co za tym ich interpretacji. Sugerowałabym w tym przypadku powściągliwość w interpretacji wyników i oparcie się głównie na analizie wyników badań metagenomicznych. Doktor Kalwasińska pisze o małej różnorodności mikroorganizmów hodowlanych, bowiem dominowały bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Halomonas* a niewiele bakterii należało do rodzajów *Planococcus* czy *Micrococcus* ale czy są zgodne z analizą metagenomiczną? Dane metagenomiczne zamieszone w pracy z *Science of the Total Environment* pokazują dużo większą różnorodność mikroorganizmów w tych samych badanych próbach. Nie doszukałam się wytłumaczenia tych rozbieżności. Tym bardziej, że w autoreferacie Habilitantka opisując wyniki pracy Kalwasińska i wsp. 2017 oparte o wysokoprzepustowe sekwencjonowanie wspomina o nieoczekiwanie zdumiewająco wysokiej różnorodności sekwencji bakteryjnych i archeonowych w badanych próbach z wapna posodowego a kilka akapitów wyżej pisze o małej różnorodności.

Dr Agnieszka Kalwasińska ustaliła listę czynników wpływających na skład badanych zbiorowisk mikroorganizmów w postaci stopnia zasolenia, uwodnienia osadów, stężeniem jonów wapnia oraz dostępności biogenów. W przypadku bakterii zaobserwowano, że czym wyższe zasolenie tym ich różnorodność była mniejsza, natomiast w przypadku zbiorowisk archeonów wraz ze wzrostem zasolenia obserwowano wzrost liczby rodzajów w badanych próbach.

W wapnie o najwyższym stopniu zasolenia stwierdzono wiele niesklasyfikowanych do poziomu rodzaju sekwencji zarówno wśród bakterii jak i archeonów co może świadczyć z jednej strony o tym, że w bazach danych posiadamy stosunkowo niewiele zdeponowanych sekwencji bakterii ze środowisk ekstremalnych, zatem nie możemy dokonać odpowiednich porównań podczas badania sekwencji a z drugiej strony mogą tam istnieć do tej pory nie odkryte gatunki.

Kolejnym ciekawym środowiskiem badanych przez Habilitantkę były chłodne solanki występujące w Kołobrzegu i Połczynie Zdrój. Próby do badań były pobierane z czterech ujęć o różnym stopniu mineralizacji, temperaturze poniżej 12^o C, izolowanymi od wód biorących udział w obiegu hydrologicznym. Ten fakt czyni wody ubogimi w składniki organiczne i tlen oraz zapobiega migracji mikroorganizmów pomiędzy warstwami. Zatem zbiorowiska mikroorganizmów występujące w tych wodach mogą być unikalne, co potwierdziły badania Habilitantki. Wśród bakterii dominowały sekwencje należące do typu w *Proteobacteria*, *Firmicutes* i *Actinobacteria*, natomiast w wodach wydobywanych z głębokości 1248 m

dominowały *Spirochaete*. Badania Habilitantki pozwoliły na określenie parametrów, które wpływają na skład taksonomiczny mikroorganizmów w postaci stężenia jonów chlorkowych, sodowych, magnezowych oraz azotanów, siarczanów jak i wysycenia wody tlenem. Z przeprowadzonych badań wynika, że podobnie jak w wapnie z produkcji sody tak i w chłodnych solankach Habilitantka wyhodowała głównie bakterie z rodzaju *Bacillus* a dominującym gatunkiem był *B. simplex*.

Badaniu poddano również gorące solanki z okolic Pырzyc i Starogardu Szczecińskiego o temperaturze odpowiednio 67 i 95⁰ C o wysokim stopniu mineralizacji. W próbach dominowały sekwencje *Proteobacteria* oraz *Firmicutes*, przy czym te ostatnie dominowały w wodach gorących. Bakterie przynależne do tego rodzaju mają zdolność tworzenia przetrwalników co zwiększa ich szanse na przeżycie w niekorzystnych warunkach środowiska. Bakterie produkujące spory mogą w niesprzyjających warunkach przetrwać miliony lat zatem struktura bakterii obserwowana w badaniach Habilitantki może być bardzo wiekowa, przez co staje się niesamowicie interesująca. Dodatkowo w gorących wodach Pырzyc i Starogardu Szczecińskiego dominowały bakterie uzyskujące energię z utleniania siarki, przyczyniając się do obiegu tego pierwiastka w ekosystemie. Odsetek niesklasyfikowanych sekwencji mikroorganizmów do poziomu rodzaju w gorących solankach był zdecydowanie wyższy niż w zimnych wodach co mogłoby świadczyć o tym, że środowiska gorących wód są mało zbadane a co za tym idzie mogą się w nich znajdować nieznane ludzkości gatunki. Habilitantka używając tylko jednego typu podłoża selekcyjnych hodowała w warunkach laboratoryjnych tylko *Bacillus paralicheniformis*, którego genom został zsekwencjonowany. Analiza porównawcza genów tego gatunku wykazała, że posiada on wiele ciekawych enzymów, które pozwalają mu na metabolizowanie zarówno związków prostych jak metan czy aminokwasy, jak i złożonych substancji organicznych takich jak skrobia czy pektyny oraz bogaty zestaw metabolitów wtórnych co czyni go potencjalnie interesującym obiektem badań. Dr Agnieszka Kalwasińska wyizolowała również endoproteazę serynową ze szczepu *Bacillus luteus* H11 pozyskanego ze środowiska wapna o wysokim zasoleniu. Wstępna charakterystyka enzymu pokazała, że jest stabilny w warunkach wysokiego pH czyli około 12, wysokiego stężenia soli (5M) oraz detergentów, utleniaczy, rozpuszczalników organicznych co czyni go potencjalnym kandydatem do wykorzystania w przemyśle spożywczym, chemii gospodarczej czy bioremediacji ekosystemów słonych.

Habilitantka autoreferat zakończyła dziesięciopunktowym podsumowaniem najważniejszych osiągnięć. Jest to element potrzebny, chociaż w tym przypadku zbyt rozbudowany a wiele z tych punktów jest oczywistych.

Ocena aktywności naukowej Habilitantki

Dorobek naukowy Habilitantki przed uzyskaniem stopnia doktora obejmował 7 publikacji wieloautorskich o łącznym IF= 1,76. Po obronie doktoratu dorobek stanowi 25 artykułów o sumarycznym IF= 45,489 z czego 19 zostało opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports i 5 artykułów nie znajdujących się tej bazie. Po doktoracie obserwujemy zdecydowany wzrost aktywności naukowej Habilitantki co oceniam bardzo pozytywnie. Autorka określa, że jej wkład w powstanie kilku z tych prac polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu analiz statystycznych, wykonaniu części eksperymentów w niektórych, na napisaniu manuskryptu czy korekcie manuskryptu po recenzjach. Stąd wnioskuję, że była to rola wiodąca. Osiągnięcie uzupełnia 9 komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach polskich i zagranicznych.. Prace Habilitantki były cytowane 158 razy a indeks Hirscha wynosi 8.

Habilitantka prowadziła prace lub współpracował z innymi zespołami w następujących aspektach:

1. Badanie oddziaływania składowiska odpadów komunalnych na środowisko, wyznaczenie stref jego wpływu a także zidentyfikowanie potencjalnych zagrożeń dla zdrowia człowieka zarówno w bezpośrednim otoczeniu terenu składowiska jak i w miejscu pracy na terenie składowiska. Prace były prowadzone w ramach grantu NCN realizowanego w latach 2010-2012.
2. Badanie wpływu bioaerozoli bakterii i grzybów na zdrowie ludzi w pomieszczeniach użyteczności publicznej takich jak biblioteka uniwersytecka.
3. Wpływ otwartych inhalatorów funkcjonujących w Ciechocinku i Inowrocławiu na obecność w powietrzu różnych grup drobnoustrojów. Współpraca z Dr hab. Aleksandrą Burkowską-But

4. Badanie zmierzające do określenia wpływu stężenia solanki na strukturę zbiorowisk bakterii i archeonów w trakcie przepływu solanki przez system tężni w Ciechocinku.
5. Określenie udziału mikroorganizmów obecnych w glebie i strefie korzeni roślin na proces oczyszczania ścieków bytowo-gospodarczych w oczyszczalni wierzbowej. Współpraca z Dr Elżbietą Lalke-Porczyk
6. Opracowanie wyników badań dotyczących wpływu pochodnych PHMG wbudowanych do biodegradowalnych polimerów na przeżywalność i aktywność enzymatyczną mikroorganizmów. Współpraca z Dr hab. Maciejem Walczakiem z UKM.
7. Oznaczenia występowania bakterii w wodach głębinowych na obszarze Niżu Polskiego. Współpraca z Dr hab. Maciejem Walczakiem.
8. Badanie bezpieczeństwa mikrobiologicznego wody mineralnej przechowywanej w domu, w pojemnikach wykonanych z politereftalenu etylenu. Współpraca z Dr hab. Aleksandrą Burkowską-But.
9. Określenie struktury mikroorganizmów w siarczkowych wodach głębinowych w uzdrowiskach na południu Polski . Współpraca z Dr hab. Arkadiuszem Krawcem oraz Dr Edytą Deją-Sikorą z UMK.
10. Charakterystyka enzymów produkowanych przez szczep promieniowca *Streptomyces luridiscabiei* U5. Współpraca z Dr hab. Marią Świontek-Brzezińską.
11. Badanie zależności zachodzących pomiędzy środowiskiem glebowym, mikroorganizmami a roślinami a w tym: ocena aktywności chitynazy pod kątem wykorzystania jej w ochronie roślin uprawnych przed infekcjami grzybiczymi, charakterystyka lipazy pod kątem bioremediacji słonych gleb skażonych substancjami ropopochodnymi, określenie wpływu środków ochrony roślin na bioróżnorodność mikroorganizmów glebowych.
12. W latach 2012-13 Habilitantka realizowała projekt polegający na opracowaniu metody pakowania świeżych warzyw w firmie Marwit.
13. W 2013 r. uczestniczyła w opracowaniu i wdrożeniu do produkcji inokulatu bakterii służącego do otrzymania paszy wysokiej jakości we współpracy z firmą Polmass z Bydgoszczy
Pani Dr Agnieszka Kalwasińska współpracuje z kilkoma zespołami z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika co świadczy o jej zaangażowaniu i

otwartości ale jej praca opiera się głównie o środki finansowe zdobyte przez innych naukowców. Habilitantka ostatni swój grant realizowała w latach 2010-2012, zatem od dziesięciu lat nie uzyskała samodzielnie większych środków na badania, co w obecnej dobie jest umiejętnością konieczną podczas prowadzenia własnego zespołu badawczego. Habilitantka brała udział w pracach aplikacyjnych, co zasługuje na szczególne podkreślenie. We współpracy z przedsiębiorstwami można również występować o środki na badania i wdrożenia ale takich informacji nie znalazłam w autoreferacie Habilitantki.

Ocena aktywności popularyzującej naukę, organizacyjnej oraz współpracy krajowej i zagranicznej

Liczba projektów, w których Habilitantka uczestniczyła, jako wykonawca obejmuje kilka projektów, dwa z nich były finansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach programu operacyjnego Kapitał Ludzki, o źródle finansowania pozostałych Habilitantka nie zamieściła informacji. Jak pisałam powyżej pani Dr Agnieszka Kalwińska współpracuje z kilkoma grupami badawczymi z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. W 2014 r. rozpoczęła współpracę naukową z Zakładem Mikrobiologii Uniwersytetu w Budapeszcie w wyniku, której powstało kilka artykułów, gdzie dwójka pracowników z tegoż Uniwersytetu jest współautorami. Habilitantka odbyła wymagany ustawowo staż w Swedish University of Agricultural Sciences w Uppsali. Celem pracy Pani Doktor było opracowanie metod pozwalających na wykrycie i zidentyfikowanie lipazy syntetyzowanej przez niektóre szczepy wyizolowane z wapna posodowego oraz z gleby, z otoczenia składowiska. Część wyników wykonanych przez Habilitantkę został opracowana, natomiast badania biochemiczne i molekularne owej lipaz są prowadzone przez Dr hab. Urszulę Jankiewicz z SGGW. W wyniku czego ma powstać publikacja pt: Ocena potencjału enzymatycznego lipazy pozyskanej z *Bacillus luteus* H11 pod kątem bioremediacji gleb słonych, skażonych substancjami ropopochodnymi. Pozostaje mi tylko wierzyć, że owa praca powstanie, co daje mi możliwość oceny istotnej aktywności naukowej Habilitantki w innej instytucji naukowej, niż jednostka zatrudniająca za wystarczającą.

Pani Doktor sprawowała opiekę nad 30 magistrantami w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii UMK, niestety nie sprawowała opieki naukowej nad

doktorantem, jako promotor pomocniczy. Prowadziła kursowe wykłady takie jak: Biotechnologia środowiska, Ekstremofile, Bakterie i grzyby, Diagnostyka mikrobiologiczna w laboratoriach przemysłowych. Habilitantka uczestniczyła w opracowaniu programu i prowadzeniu ćwiczeń na kierunku Ochrona Środowiska, Biotechnologia i Diagnostyka Mikrobiologiczna. Ilości prowadzonych przez Habilitantkę ćwiczeń jest imponująca i uprawnia do wyciągnięcia wniosku, iż posiada duże doświadczenie w pracy z młodzieżą co z pewnością ułatwi jej skompletowanie własnego zespołu. Na uwagę zasługuje fakt recenzowania przez Panią Doktor Agnieszkę Kalwasińską 16 artykułów w czasopiśmie naukowych, co świadczy o tym, że jest rozpoznawana w środowisku a jej tematyka badawcza i aktywność publikacyjna zostały zauważone przez międzynarodowe gremium i zaowocuje to w niedalekiej przyszłości większą liczbą wykonanych recenzji i współpracą

Habilitantka uczestniczyła w Festiwalu Nauki, Nocy Biologów, Dniu Otwartym na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska. Organizowała zajęcia pokazowe dla uczniów szkół podstawowych.

Pani Doktor Agnieszka Kalwasińska odbyła szkolenie w zakresie technik PCR, analiz statystycznych i eksploracji danych; narzędzi służących wizualizacji dużych zbiorów danych; technik wyszukiwania, przetwarzania i zarządzania informacją oraz nowoczesnych metod nauczania, co świadczy o jej zaangażowaniu w pracę dydaktyczną i chęci samokształcenia. Za pracę naukową otrzymała kilkakrotnie Nagrodę Rektora UMK.

Moja ocena aktywności popularyzującej naukę oraz organizacyjnej jak i współpracę Habilitantki z ośrodkami naukowymi oceniam pozytywnie.

Wnioski Końcowe

Oceniając osiągnięcie habilitacyjne konieczne jest zwrócenie uwagi jakie wymagania stawia w tym względzie ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. o szkolnictwie wyższym i nauce, aby wskazywało ono na znaczny wkład autora w rozwój określonej dyscypliny naukowej, co moja recenzja potwierdza. Przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Habilitacyjna Pani Dr Agnieszki Kalwasińskiej spełnia wymogi stawiane osiągnięciom tego typu. Habilitantka wykazała się ponadto istotną aktywnością naukową czym spełniła kolejny wymóg ustawy. W

związku z powyższym popieram wniosek o nadanie Pani Doktor Agnieszce Kalwsińskiej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne.



PRACOWNIA
Biologii Molekularnej IBB PAN

Węgrzyn
Prof. PAN, dr hab. Alicja Węgrzyn