

Prof. dr hab. Monika Janczarek
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
mon.jan@poczta.umcs.lublin.pl

Opinia na temat osiągnięcia naukowego

pt. „Zbiorowiska bakteryjne i archeonowe ekstremalnych środowisk o różnym stopniu zasolenia”, aktywności naukowej oraz działalności dydaktycznej i organizacyjnej dr Agnieszki Kalwasińskiej w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych

Podstawą do przygotowania opinii była dokumentacja dostarczona w formie papierowej i elektronicznej przez Przewodniczącego Rady Dyscypliny dr. hab. Dariusza J. Smolińskiego, prof. UMK. Dokumentacja zawierała wymagane załączniki, w tym autoreferat Habilitantki oraz wykaz opublikowanych prac i informacje o Jej działalności dydaktycznej i organizacyjnej. Do wniosku dołączono artykuły stanowiące wskazane osiągnięcie naukowe wraz z oświadczeniami współautorów oraz inne wybrane prace opublikowane przez Habilitantkę.

Sylwetka Habilitantki

Dr Agnieszka Kalwasińska od początku swojej działalności naukowej jest związana z macierzystą jednostką naukową – Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu. Na tej uczelni uzyskała tytuł magistra w 2000 r., a następnie obroniła rozprawę doktorską w 2008 r., przygotowaną pod opieką promotorską prof. Wojciecha Donderskiego. Po ukończeniu studiów magisterskich Agnieszka Kalwasińska została zatrudniona w 2001 r. na stanowisku asystenta, a po obronie doktoratu na stanowisku adiunkta (2010 r.).

Ocena osiągnięcia naukowego

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe dr Agnieszki Kalwasińskiej pt. „Zbiorowiska bakteryjne i archeonowe ekstremalnych środowisk o różnym stopniu zasolenia” stanowi cykl powiązanych tematycznie sześciu prac eksperymentalnych, opublikowanych w latach 2015-2020. Prace te ukazały się w czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports: Polish Journal of Microbiology (2015), Antonie van Leeuwenhoek (2017), Food Technology and Biotechnology (2018), Science of the Total Environment (2019a), Geomicrobiology Journal (2019b) i Applied and Environmental Microbiology (2020). Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (IF) tych artykułów wynosi 15,13, a ich punktacja według MNiSW - 400 pkt. Prace te są wieloautorskie i liczą czterech (2 artykuły), pięciu (1 artykuł) i siedmiu autorów (3 artykuły). We wszystkich tych pracach dr A. Kalwasińska jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Z oświadczeń współautorów wynika, że rola Habilitantki w powstawaniu tych artykułów była wiodąca, gdyż polegała

m.in. na zdefiniowaniu problemu badawczego, sformułowaniu celów, zaplanowaniu doświadczeń i napisaniu prac. W świetle tych danych nie mam wątpliwości, że zawarte we Wniosku prace mogą być wskazane jako osiągnięcie naukowe dr Agnieszki Kalwasińskiej i stanowić podstawę postępowania habilitacyjnego.

Nadrzędnym celem badań Habilitantki opisanych w osiągnięciu naukowym była charakterystyka występujących w Polsce ekstremalnych środowisk sztucznych i naturalnych o różnym stopniu zasolenia, pod kątem poznania liczebności oraz struktury zbiorowisk bakteryjnych i archeonowych. Badania te rozpoczęto od identyfikacji mikroorganizmów występujących w wapnie posodowym, będącym produktem ubocznym wytwarzania sody metodą Solvay'a w Janikowskich Zakładach Sodowych SODA CIECH SA (Kalwasińska i wsp., 2015; 2017; 2018; 2019a). Następnie Habilitantka scharakteryzowała zbiorowiska mikroorganizmów występujących w chłodnych (temp. $<12^{\circ}\text{C}$) wodach podziemnych, wykorzystywanych do celów terapeutycznych w Kołobrzegu i Połczynie Zdroju (Kalwasińska i wsp., 2019b) i solankach termalnych (temp. $>60^{\circ}\text{C}$), mających zastosowanie w geotermiach Pyrzyc i Stargardu Szczecińskiego (Kalwasińska i wsp., 2020). W swoich badaniach Habilitantka stosowała różnorodne metody mikrobiologiczne, biochemiczne i molekularne (np. wysokoprzepustowe sekwencjonowanie ampikonów 16S rDNA oraz sekwencjonowanie całych genomów).

W początkowym okresie dr Agnieszka Kalwasińska prowadziła badania dotyczące wapna posodowego, pobieranego z różnych głębokości stawów osadowych Janikowskich Zakładów Sodowych, które było silnie alkaliczne (pH 11) i ubogie w biogeny, a różniło się stopniem zasolenia (3-30% NaCl). Ustaliła, że w wapnie o najwyższym stopniu zasolenia (26% NaCl) liczebność mikroorganizmów była istotnie niższa niż w wapnie o niskim (2%) i średnim zasoleniu (14%). Ponadto wykazała, że różnorodność mikroorganizmów hodowalnych była niska i większość uzyskanych szczepów należała do fakultatywnych alkalifili i umiarkowanych halofili. Co ciekawe, potwierdzono występowanie przedstawicieli zaledwie 6 rodzajów bakteryjnych, wśród których dominowały bakterie z rodzaju *Bacillus* oraz *Halomonas*. Habilitantka uzyskała również ciekawe wyniki dotyczące właściwości enzymatycznych wyizolowanych szczepów. Wykazała, że wiele z tych szczepów posiadało zdolność syntezy zewnątrzkomórkowych esteraz, β -glukozydaz i proteaz, aktywnych w warunkach wysokiego odczynu (pH 10) i zasolenia (3% NaCl), które mogą mieć potencjalne zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Wyniki te przyczyniły się do podjęcia przez dr A. Kalwasińską bardziej szczegółowych badań dotyczących proteaz, których celem była charakterystyka biochemiczna tego typu enzymów. Uważam za bardzo wartościowe wyniki dotyczące enzymu z grupy endoproteaz serynowych produkowanego przez szczep *Bacillus luteus* H11, który został pozyskany przez Habilitantkę ze zbiornika wapna o najwyższym zasoleniu. Enzym ten charakteryzował się wysoką stabilnością w warunkach wysokiego odczynu i stężenia soli, wysoką odpornością na surfaktanty, niektóre rozpuszczalniki organiczne i jony metali ciężkich, co wskazuje na jego duże możliwości aplikacyjne (Kalasińska i wsp., 2018).

W kolejnych latach swojej pracy dr A. Kalwasińska poszerzyła znacząco swój warsztat metodyczny o nowoczesne metody molekularne, co w mojej ocenie umożliwiło przeprowadzenie bardziej wnikliwych analiz metagenomicznych badanych ekosystemów i

zaowocowało uzyskaniem wielu interesujących wyników. Badania molekularne z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania ampikonów 16S rDNA pozwoliły na wykazanie, że wapno posodowe charakteryzuje się nieoczekiwanie wysoką różnorodnością sekwencji bakteryjnych (Kalasińska i wsp., 2017). Bardziej zaawansowane badania opisane w pracy Kalwasińska i wsp. 2019a potwierdziły, że silnie alkaliczne i w różnym stopniu zasolone wapno jest rezerwuarem mikroorganizmów o niespodziewanie wysokiej bioróżnorodności, uwzględniając warunki i krótki czas powstawania tego ekosystemu. Habilitantka wykazała, że liczba rodzajów mikroorganizmów i ich bioróżnorodność (mierzona wskaźnikiem różnorodności Shannona) były wyższe w przypadku zbiorowisk bakteryjnych niż archeonowych (wyodrębniono ponad 1800 bakteryjnych operacyjnych jednostek taksonomicznych - OTU (*operational taxonomic units*), należących do 36 typów wśród domeny *Bacteria* oraz około 400 OTU archeonowych należących do 8 typów wśród domeny *Archaea*). Co ciekawe, struktura zbiorowisk bakteryjnych na poziomie typu, charakteryzująca się znacznym udziałem bakterii należących do *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, i *Actinobacteria*, była podobna do zbiorowisk bakteryjnych zamieszkujących naturalne haloalkaliczne środowiska.

Za bardzo ciekawe i cenne uważam wyniki uzyskane przez dr Kalwasińską dotyczące zbiorowisk archeonowych. Habilitantka wykazała, że zbiorowiska zdominowane przez przedstawicieli klasy *Halobacteria* były podobne pod tym względem do zbiorowisk archeonów w ekstremalnie słonych i alkalicznych glebach. Ponadto, ustaliła ilościowe proporcje pomiędzy archeonami a bakteriami dla wapna o niskim (2%) i umiarkowanym poziomie zasolenia (14% NaCl) na około 0,5%, a dla wapna o najwyższym poziomie zasolenia - 1%. Wykazała również, że struktura zbiorowisk bakteryjnych i archeonowych na poziomie rodzaju była wysoce specyficzna dla danego rodzaju wapna. Ze względu na brak wystarczającej ilości sekwencji w bazach danych nie udało się sklasyfikować części z uzyskanych przez Habilitantkę sekwencji. Wskazuje to na fakt, iż mimo znacznego wzrostu badań nad archeonami, ich różnorodność wciąż w znacznym stopniu pozostaje nieodkryta.

W późniejszym okresie dr A. Kalwasińska skupiła się na badaniach dotyczących chłodnych solanek terapeutycznych Kołobrzegu i Połczyna Zdroju (Kalwasińska i wsp. 2019b) i solanek termalnych Pyrzyc i Stargardu Szczecińskiego (Kalwasińska i wsp., 2020). Habilitantka potwierdziła, że liczba mikroorganizmów w obu typach solanek była podobna i bardzo niska (10^3 - 10^4 komórek/ml) i podobna do liczebności mikroorganizmów w innych ekosystemach wód podziemnych. Wykazała, że zbiorowiska bytujące w tych solankach charakteryzują się niską bioróżnorodnością. Na podobnym poziomie (10^1 - 10^2 CFU/ml) prezentowała się również liczebność mikroorganizmów heterotroficznych i ich różnorodność. Zbiorowiska bakteryjne chłodnych wód mineralnych były zdominowane przez sekwencje należące do *Delta*- i *Gammaproteobacterii*. Analizując strukturę zbiorowisk badanych wód na poziomie rodzaju, Habilitantka potwierdziła, że były one specyficzne dla danego ujęcia wody, co wskazuje na istotną rolę własności fizyko-chemicznych w determinacji składu zbiorowisk bakteryjnych w podziemnych ekosystemach. Solanki termalne z Pyrzyc i Stargardu Szczecińskiego to wody gorące, wysoko zmineralizowane (TDS około 12 i 14%), o temperaturze w złożu równej 67°C i 95°C. Zaobserwowano ciekawą i wartą podkreślenia różnicę między chłodnymi a gorącymi wodami, że dominujące w strukturze zbiorowiska

bakteryjnego solanek Pyrzyca i Stargardu są organizmy utleniające związki siarki, a nie organizmy zdolne do redukcji siarczanów jak to zostało wykazane dla wód z Kołobrzegu i Połczyńska Zdroju. Innym cennym spostrzeżeniem jest jedynie niewielki udział przedstawicieli domeny *Archaea* w solankach podziemnych, gdyż Habilitantka wykryła w obu typach solanek tylko jedno OTU przypisane do tej domeny.

Analizując skład gatunkowy mikroorganizmów wyizolowanych z solanek termalnych, które były zdolne do wzrostu w temperaturze 60°C, dr Kalwasińska wykazała, że należały one głównie do gatunku *Bacillus paralicheniformis*. Przeprowadzone przez Habilitantkę szczegółowe analizy genomu szczepu TS6 - jednego z przedstawicieli *B. paralicheniformis* ujawniły, że prezentuje on odrębny, nowy podgatunek. Godnym podkreślenia jest fakt wyizolowania przez Habilitantkę w trakcie prowadzenia swoich badań licznych szczepów bakteryjnych odpornych na wysokie zasolenie i niewielkich wymaganiach odżywczych, które stanowią obiecujące źródło substancji biologicznie czynnych do wykorzystania w biotechnologii.

Podsumowując, do najważniejszych wyników badań zawartych w osiągnięciu naukowym dr Agnieszki Kalwasińskiej zaliczam:

- 1) wykazanie, że zasolenie to ważny czynnik abiotyczny wpływający na skład i strukturę zbiorowisk mikroorganizmów w badanych ekosystemach;
- 2) wykazanie, że wzrost zasolenia w wapnie posodowym powoduje zwiększenie liczby archeonowych OTU, a powoduje zmniejszenie liczby bakteryjnych OTU i ich bioróżnorodności;
- 3) potwierdzenie, że sekwencje przypisane domenie *Archaea* w „starych” wodach infiltracyjnych stanowią mało liczny komponent zbiorowiska mikroorganizmów;
- 4) wykazanie, że mikroorganizmy występujące w przebadanych przez Habilitantkę ekstremalnych środowiskach stanowią ważne źródło enzymów o potencjalnym zastosowaniu biotechnologicznym.

Ocena całkowitej aktywności Habilitantki

Całkowity dorobek publikacyjny dr Agnieszki Kalwasińskiej obejmuje współautorstwo 32 prac naukowych opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, 5 prac opublikowanych w czasopiśmie recenzowanych spoza listy JCR, 1 monografię, 3 rozdziałów w monografiach oraz 26 komunikatów naukowych. Po odjęciu prac stanowiących wskazane osiągnięcie naukowe, w okresie po doktoracie (2008-2020) ukazało się ogółem 19 prac z listy JCR, 5 prac spoza listy JCR, 1 monografia, 3 rozdziały w monografiach i 21 komunikatów zjazdowych. Sumaryczna wartość współczynnika IF wszystkich prac Habilitantki wynosi 46,949, Pkt MNiSW – 1067, indeks Hirsch’a 8, a całkowita liczba cytacji bez autocytowań wynosi 139 (według Web of Science). W mojej opinii są to wartości dobre na tym etapie rozwoju naukowego. Na podkreślenie zasługuje fakt, że znacząca większość tych prac powstała po uzyskaniu stopnia doktora, co wskazuje na istotne zwiększenie aktywności naukowej dr Kalwasińskiej w tym okresie (sumaryczny IF prac przed uzyskaniem stopnia doktora - 1,76, a po uzyskaniu stopnia doktora – 45,489).

Tematyka badań prowadzonych przez Habilitantkę koncentruje się niezmiennie wokół szeroko pojętej mikrobiologii środowiskowej, obejmującej monitorowanie czystości mikrobiologicznej wody, gleby i powietrza. Z tą tematyką była związana rozprawa doktorska, jak również realizowane przez Habilitantkę projekty badawcze finansowane ze źródeł UMK oraz funduszy zewnętrznych. Niewątpliwie zasadniczy wpływ na ukształtowanie tych zainteresowań i tak silną specjalizację odegrało środowisko naukowe macierzystej jednostki - Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK, o dużych tradycjach i osiągnięciach w badaniach z zakresu mikrobiologii środowiskowej wodnych ekosystemów.

Główne zainteresowania dr A. Kalwasińskiej dotyczą identyfikacji mikroorganizmów w różnych ekosystemach wodnych oraz wpływu antropopresji na zbiorowiska tych mikroorganizmów. Habilitantka zajmuje się też zagadnieniami związanymi z mikrobiologią przemysłową oraz poszukiwaniem zastosowań dla wyizolowanych szczepów i enzymów.

Co ważne, dr Kalwasińska skutecznie pozyskuje środki na prowadzenie badań - dotychczas kierowała 2 projektami badawczymi finansowanymi przez KBN (2005-2007) i NCN (2010-2012). Habilitantka brała także udział w realizacji projektów we współpracy z otoczeniem gospodarczym. W latach 2012-2013 uczestniczyła w realizacji dwóch projektów, które były finansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach programu operacyjnego Kapitał Ludzki (6-miesięczny staż w przedsiębiorstwie produkcyjnym Marwit Sp. z o.o. i współpraca z firmą Polmass S.A. w ramach projektu "Opracowanie biotechnologiczne i wdrożenie do produkcji inokulantu mikrobiologicznego służącego do otrzymywania pasz wysokiej jakości").

Na uwagę zasługuje również aktywność Habilitantki w nawiązywaniu współpracy z zagranicznymi ośrodkami naukowymi. W 2014 r. rozpoczęła współpracę naukową z Zakładem Mikrobiologii Eötvös Lorand (Uniwersytet w Budapeszcie) i współpraca ta zaowocowała powstaniem 5 publikacji, wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego. W 2015 r. dr Kalwasińska uzyskała stypendium finansowane przez The Swedish Institute, którego celem było nawiązanie współpracy między środowiskami naukowymi Szwecji i innych krajów nadbałtyckich, w tym Polski. W ramach tego stypendium Habilitantka odbyła półroczny staż w Zakładzie Mikrobiologii oraz Zakładzie Mykologii Leśnej i Patologii Roślin (Swedish University of Agricultural Sciences). Habilitantka wykazała się również dużą aktywnością w recenzowaniu manuskryptów do czasopism z listy JCR, co wskazuje że jest rozpoznawalnym specjalistą w zakresie hydromikrobiologii. Zabrakło mi jednak w autoreferacie bardziej dalekosiężnych planów badawczych Habilitantki, dających wyobrażenie o kierunkach Jej dalszego rozwoju naukowego.

Podsumowując, pozytywnie oceniam aktywność naukową dr Agnieszki Kalwasińskiej. Uważam, iż posiada Ona znaczny dorobek naukowy poza osiągnięciem naukowym, jak również umiejętność w nawiązywaniu współpracy z innymi grupami badawczymi w kraju i za granicą. Tym samym, Habilitantka spełnia wymogi stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora habilitowanego.

Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Dr Agnieszka Kalwasińska od wielu lat prowadzi liczne zajęcia dydaktyczne z zakresu mikrobiologii i biotechnologii. Na liście tej znajdują się: wykłady, ćwiczenia i zajęcia

fakultatywne dla studentów UMK różnych kierunków studiów (Ochrona środowiska, Biotechnologia, Chemia kosmetyczna, Diagnostyka mikrobiologiczna) oraz studentów zagranicznych przyjeżdżających w ramach programu Erasmus+ (Metagenomics, Biostatistics - zajęcia w języku angielskim). Habilitantka brała również udział w kilku projektach edukacyjnych. Ponadto, była opiekunem naukowym wielu prac magisterskich (9 przed i 30 po uzyskaniu stopnia doktora). Jest współautorem skryptu „Podstawy mikrobiologii w teorii i praktyce” wydanego przez Wydawnictwo Naukowe UMK (2013 r.). Przytoczone dane przekonują, że dr A. Kalwasińska jest doświadczonym nauczycielem akademickim. Habilitantka była także zaangażowana w prowadzenie warsztatów i pokazów w ramach Toruńskiego Festiwalu Nauki, Nocy Biologów, Dni Otwartych Wydziału BiOŚ oraz zajęć dla uczniów szkół podstawowych. Dane te wskazują na aktywny udział dr A. Kalwasińskiej w kształceniu młodej kadry naukowej oraz popularyzacji nauki.

Nieco niżej oceniam działalność organizacyjną Habilitantki. Z przesłanej dokumentacji wynika, że była sekretarzem dwóch konferencji: II i X Ogólnopolskiej Konferencji Hydromikrobiologicznej w Toruniu w 2002 i 2019 r.

Podsumowując, pozytywnie oceniam działalność dydaktyczną i organizacyjną dr A. Kalwasińskiej i uważam, że spełnia ona wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Oceniane osiągnięcie habilitacyjne, stanowiące cykl tematycznie powiązanych artykułów naukowych, zawiera wartościowe informacje na temat zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających ekstremalne środowiska o różnym stopniu zasolenia. Analiza przedstawionych prac przekonuje, że Habilitantka jest doświadczonym badaczem, potrafiącym odpowiednio sformułować problem badawczy, zaproponować koncepcję badań, a po zrealizowaniu zaplanowanych badań, skutecznie opublikować uzyskane wyniki w międzynarodowych czasopismach.

Uważam, że przedstawione osiągnięcie naukowe pt. „Zbiorowiska bakteryjne i archeonowe ekstremalnych środowisk o różnym stopniu zasolenia” oraz całokształt osiągnięć naukowo-badawczych, dydaktycznych, organizacyjnych i współpracy naukowej dr Agnieszki Kalwasińskiej spełnia kryteria określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r., poz. 85) stawiane osobom ubiegającym się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego. Wnoszę zatem o nadanie dr Agnieszce Kalwasińskiej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych.

prof. dr hab. Monika Janczarek

Lublin, 25 stycznia 2021 r.