Toruń, 23.06.2018

Prof. dr hab. Hanna Dahm
Zakład Mikrobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Tomasza Cłapy pt." Analiza zespołów mikrobiologicznych tworzących biofilmy w strefach hipergenicznych wybranych złóż kruszców w Sudetach".

Pracę doktorską wykonano w Katedrze Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.
Opiekunem naukowym i promotorem pracy jest dr hab. Marek Selwet; promotorem pomocniczym dr hab. Dorota Narożna.
Oceny pracy dokonano na podstawie nadesłanego egzemplarza pracy doktorskiej z załączonymi trzema publikacjami, będącymi podstawą ocenianej pracy doktorskiej.
Do pracy doktorskiej dołączono również informacje o pozostałych osiągnięciach naukowych doktoranta, na które składają się inne publikacje, nie wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, udział w konferencjach, odbyte staże naukowe, recenzje prac złożonych do druku w czasopismach, kierowanie grantem, udział w projektach naukowych oraz otrzymane nagrody.

Podstawą oceny pracy doktorskiej są trzy prace opublikowane w latach 2016, 2017 i 2018. W każdej z tych prac mgr Tomasz Cłapa jest pierwszym autorem, a jego wkład w powstanie prac wynosił od 50% do 75% i obejmował koncepcję badań, udział w opracowaniu metod badań, wykonanie doświadczeń i analiz, opracowanie wyników i dominujący udział w przedstawieniu dyskusji.

Dwie z przedstawionych prac są oryginalnymi pracami eksperymentalnymi, opublikowanymi w casopsmach indeksowanych: *Polish Journal of Microbiology* (IF 0,746, pkt MNiSW 15) i *Polish Journal of Environmental Studies* (IF 0,793, pkt MNiSW 15 (w druku).

Praca najwcześniejsza jest artykułem przeglądowym, opublikowanym w czasopiśmie *Kosmos* z punktacją MNiSW wynoszącą 5. W tej pracy, zatytułowanej „ Życie w społeczności – warunki powstawania biofilmu" omawiane są etapy tworzenia się biofilmu, oddziaływanie środowiska na biofilm i biofilmu na środowisko oraz komunikacja między bakteriami tworzącymi biofilm.

W oryginalnych pracach badawczych analizowano i scharakteryzowano biofilmy utworzone w nieczynnych kopalniach, środowiskach podlegających silnym presjom antropogenicznym.

Praca opublikowana w 2017 roku „*Bacterial Communities from Arsenic Mine in Złoty Stok, Sudety Mountains, Poland*" zawiera wyniki badań nad zespołem bakterii tworzących biofilm i charakterystykę mineralogiczną nieczynnej kopalni zawierającej arsen i złoto. pH środowiska wynosiło 7.

Biofilm uznawany jest za najstarszą formę wielokomórkowego życia, który chroni organizmy przed szkodliwymi fizycznymi i chemicznymi czynnikami środowiska, takimi jak szok osmotyczny, promieniowanie UV, promieniowanie jonizujące, metale ciężkie, ekstremalne temperatury i pH.

Stosując nowoczesne metody mikroskopowe, takie jak skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), mrożeniowa skaningowa mikroskopia elektronowa (Cryo-SEM), analiza dyspersji energii (EDS), dyfrakcja rentgenowska (X-Ray Diffraction), we współpracy z Wydziałem Geologii Uniwersytetu Warszawskiego, doktorant scharakteryzował jakościowo i ilościowo kopalniane minerały oraz powierzchnię biofilmu. Obecność pikrofarmakolitu uznał za powszechnie występujący w kopalni wtórny minerał arsenowy. Kolonie bakteryjne były otoczone kryptokrystalicznym siarczkiem arsenu.

Molekularna identyfikacja bakterii wykazała szeroki zakres grup filogenetycznych, takich jak *Flavobacteria, Sphingobacteria, Bacteroides, Proteobacteria, Mollicutes* i *Firmicutes.*

Druga oryginalna praca badawcza *„Diversity of the bacterial communities of Acid Mine Drainage ecosystem of abandoned polymetalic mine in Radzimowice, Sudety Mountains, Poland*" przedstawia wyniki badań nad tworzeniem biofilmu przez bakterie w kopalni polimetalicznej, z obecnymi kwaśnymi wodami kopalnianymi, które powodują, że pH środowiska jest bardzo niskie i wynosi 1.0 -1.5.

Analizy geochemiczne (wykonane we współpracy z Wydziałem Geologii Uniwersytetu Warszawskiego) wykazały wysokie stężenie metali, szczególnie arsenu i żelaza pochodzących z rozkładu arsenopirytu.

Analizy Cryo-SEM biofilmu uwidoczniły zewnątrzkomórkową polisacharydową matrix z zanurzonymi w

niej minerałami, co wskazywało na związek pomiędzy bakteriami i otaczającymi je biotransformowanymi minerałami. Wykazano siedem mineralnych faz związanych z biofilmem.
Analiza molekularna składu mikrorganizmów tworzących biofilm wykazała obecność bakterii należących do trzech grup filogenetycznych: *Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria.* Dominowały bakterie utleniające żelazo.
Analiza przedstawionych prac uwidoczniła, że dla pełnego określenia składu gatunkowego mikroorganizmów zasiedlających środowiska naturalne, a szczególnie środowiska ekstremalne, konieczne jest wykorzystanie kompleksowych nowoczesnych metod badawczych.
Przy użyciu nowoczesnych metod możliwe jest wykazanie jakie typy minerałów mogą być wytwarzane i transformowane przez mikroorganizmy i jako rezultat procesów wietrzenia oraz wykazanie udziału bakterii w geochemicznym cyklu minerałów. Możliwe jest wykazanie nienaruszonej egzopolisacharydowej matrix , chroniącej bakterie przed niekorzystnymi warunkami środowiska, a także dokładnie zidentyfikować wszystkie bakterie tworzące biofilm, hodowalne i niehodowalne.
Metody zastosowane przez autora publikacji obejmowały izolację genomowego DNA, amplifikację DNA, klonowanie produktów PCR, ligację do wektora, transformację komórek kompetentnych, selekcję transformantów, analizę produktów PCR oraz izolację plazmidowego DNA.

Mgr inż. Tomasz Cłapa, zgodnie z wymogami, opracował syntezę pracy doktorskiej i przedstawił w tradycyjnej oprawionej formie. Według mojej opinii jest to za bardzo uproszczona forma, nazwałabym ją raportem. Zarówno bardzo krótki Wstęp jak i Wyniki i Dyskusja nie mają charakteru rozprawy naukowej. Wyczerpująco są tylko przedstawione Metody badań.

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze mgr Tomasza Cłapy

Na szczególne podkreślenie zasługują badania interakcji komórek bakteryjnych z nanomateriałami lub cieczami jonowymi, prowadzone we współpracy z Wydziałem Nowych Technologii i Chemii Wojskowej Akademii Technicznej oraz z Uniwersytetem Warszawskim. Rozwój nanotechnologii, nowej dziedziny nauki, jest fascynującym obszarem badań z możliwością zastosowania w przemyśle i medycynie.
Mgr Tomasz Cłapa Jest współautorem prac zawierających wyniki badań nad adsorbcją Gram-ujemnych bakterii na powierzchni aglomeratów nanowłókien i nanoprętów węglika krzemu, a także analizę toksyczności takich struktur względem bakterii. Badał również wpływ nanokompozytów na bazie nanowłókien węglika krzemu i srebra na bakterie, a szczególnie na generowanie przez nie reaktywnych form tlenu oraz wybranych genów systemu SOS. Wyniki umieszczono w czterech pracach

opublkowanych w takich czasopismach jak *Applied Biochemistry and Biotechnology, Chemosphere, Nanomaterials, Carbon.*

Kolejny obszar zainteresowań obejmuje wpływ cieczy jonowych na komórki bakteryjne. Jest to problem badawczy mało jeszcze zgłębiany, chociaż o dużym znaczeniu biotechnologicznym, głównie ze względu na możliwości zastąpienia nimi organicznych, toksycznych rozpuszczalników w różnych procesach przemysłowych włącznie z przemysłem farmaceutycznym. Wyniki tych badań zawierają prace opublikowane w *Ecotoxicology and Environmental Safety* oraz *Journal of Molecular Liquids.*

Całowity numeryczny dorobek naukowy mgr Tomasza Cłapy jest wysoki i wynosi: IF 32,136, suma punktów MNiSW 345, h-index = 4.

Na podkreślenie zasługuje odbycie sześciu staży naukowych, krajowych i zagranicznych (University of Natural Resources and Life Science Vienna, University of Edinburgh, Institute of Chemical Technology, Praga, Instytut Chemii Fizycznej PAN, Instytut Geochemii, Mineralogii i Petrologii Uniwersytet Warszawski, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN.

Podsumowanie i Wniosek końcowy

Prace zawierające wyniki badań, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, opublikowano w czasopismach z listy *JCR*, chociaż o niezbyt wysokiej punktacji. Pracę przeglądową, nie zawierającą wyników badań, ale tematycznie spójną z problematyką badawczą opublikowano w czasopiśmie o niskiej punktacji MNiSW.

Jednakże, jako recenzentka pracy doktorskiej wysoko oceniam osiągnięcie naukowe mgr inż. Tomasza Cłapy.

Wybrał bardzo interresujący obszar badań, zastosował nowoczesne metody badawcze, zarówno mikroskopowe, spektralne jak i molekularne. Uzyskał interesujące wyniki badań.

Wskazał na możliwości dokładnego obrazowania zespołów mikroorganizmów rozwijających się i tworzących biofilmy w środowiskach ekstremalnych, jakie dają nowoczesne metody badań.

Praca doktorska ma wysoką wartość naukową, merytoryczną i metodyczną.

Składam do Wysokiej Rady Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wniosek o dopuzczenie mgr inż. Tomasza Cłapy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Hanna Dahm