

Prof. dr hab. Barbara Pawlik-Skowrońska

Lublin, 28. 10. 2016

Katedra Hydrobiologii

Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ul. Dobrzańskiego 37

20-262 Lublin

Ocena

osiągnięcia naukowego p.t. „ Mikrobiologiczna degradacja toksyn sinicowych mikrocytyn” oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Dariusza Dzigi, w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych, w dyscyplinie biochemia.

Niniejsza ocena została dokonana na podstawie następujących materiałów:

1. Kopia dyplomu doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii
2. Autoreferat zawierający opis osiągnięcia naukowego habilitanta (5 prac oryginalnych i 1 praca przeglądowa) oraz omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych na tle aktualnego stanu wiedzy.
3. Kopie 6 publikacji składających się na osiągnięcie naukowe habilitanta
4. Lista opublikowanych prac naukowych habilitanta
5. Kopie 8 najważniejszych publikacji stanowiących część pozostałego dorobku
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki.
7. Oświadczenia współautorów

1. Informacja o kandydacie

Pan dr Dariusz Dziga jest absolwentem Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie w 1997 r. w Instytucie Biologii Molekularnej uzyskał tytuł zawodowy magistra biologii w zakresie biologii molekularnej. W 2001 r. w tym samym Instytucie nadano mu stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii na podstawie rozprawy p.t. „ Wpływ bis/maltolato/oxowanadu/IV/ na aktywność biochemiczną oraz morfologię aparatu Golgiego wątroby szczurów kontrolnych i z cukrzycą wywołaną streptozotocyną”, której promotorem była doc. dr hab. Anna Kordowiak, wykonanej w ramach projektu finansowanego przez KBN, którego kierownikiem był dr Dziga. W autoreferacie

habilitant bardzo skrótowo przedstawił swą drogę rozwoju naukowego i kariery zawodowej, wskazując jedynie, że obecnie pracuje jako adiunkt w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Głębsza analiza afiliacji habilitanta oraz wykaz doniesień konferencyjnych w okresie 1997-2001 pozwoliło recenzentowi na stwierdzenie, że habilitant przed uzyskaniem stopnia doktora był pracownikiem w Zakładzie Biochemii Zwierząt, Instytutu Biologii Molekularnej, Uniwersytetu Jagiellońskiego.

2. Ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy habilitanta (oprócz 6 prac wskazanych jako osiągnięcie naukowe) składa się z 19 opublikowanych współautorskich prac notowanych w bazie JCR, oraz 1 pracy przeglądowej opublikowanej w Postęпах Biologii Komórki i 29 komunikatów konferencyjnych - na 13 konferencjach międzynarodowych i 13 krajowych. W ok. 90 % publikacje te powstały po uzyskaniu stopnia doktora. W połowie z prac oryginalnych o zasięgu międzynarodowym dr Dziga jest pierwszym lub drugim autorem, co świadczy o jego znaczącej roli w ich powstaniu. W większości są to prace opublikowane w międzynarodowych czasopismach o wysokiej randze, takich jak: Plant and Soil, Mutagenesis, Toxicon, Chemosphere, Environmental Toxicology, Journal of Phycology, Toxins, Acta Physiologiae Plantarum i innych. **Wysoki poziom merytoryczny prac i zainteresowanie nimi w międzynarodowym środowisku naukowym znalazło swoje odzwierciedlenie w znacznej liczbie cytowań – 219 (bez autocytowań) notowanych w bazie Web of Science, która niewątpliwie wzrosnie ponieważ część prac powstała w ostatnich 3 latach. Indeks Hirscha = 9.**

Niestety, w materiałach przedstawionych przez habilitanta można zauważyć pewne nieścisłości lub niedociągnięcia, które utrudniały zapoznanie się z dorobkiem naukowym habilitanta: np. w liście publikacji naukowych zamieszczonych w załączniku nr 5, w pozycji nr 2 brak nazwiska pierwszego autora Kien T. Mai, natomiast w załączniku nr 4, w wykazie doniesień konferencyjnych w pozycji nr 1 w ogóle nie wskazano autorów posteru.

Analiza merytoryczna dorobku naukowego dr Dziga pozwala na wyróżnienie w nim 3 części: pierwszej - dotyczącej badań rozpoczętych na początku drogi naukowej (włącznie z doktoratem) i obejmującej zagadnienia efektów oddziaływania organicznych pochodnych wanadu na organelle (aparatus Golgiego) i metabolizm (głównie aktywność enzymatyczną) komórek zwierzęcych. Efektem jest współautorstwo w 4 pracach oryginalnych, 4 doniesieniach konferencyjnych oraz autorstwo 1 pracy przeglądowej.

Drugi etap pracy naukowej habilitanta obejmuje zaangażowanie w badania nad rolą związków odżywczych (różnych form azotu i węgla) na skład aminokwasowy tkanek oraz przyrost biomasy organów różnych stadiów rozwojowych pomidora. Efekt to współautorstwo w 3 pracach oryginalnych i 1 doniesienie konferencyjne.

Trzeci, najbardziej owocny etap w pracy naukowej dr D. Dzigi dotyczy problemu niektórych toksycznych metabolitów wtórnych produkowanych przez sinice (cyjanobakterie) – mikrocytyn i cylindropermopsyny (stanowiących zagrożenie dla zdrowia człowieka oraz innych organizmów żywych), ich interakcji z organizmami żywymi oraz poszukiwania sposobów ich degradacji (fizyko-chemicznej oraz biologicznej). Zainteresowania dr Dzigi toksynami produkowanymi przez sinice rozwinęły się po uzyskaniu stopnia doktora, co zaowocowało współautorskimi pracami zrealizowanymi w ramach projektów finansowanych przez KBN i MPWiK Kraków oraz Rektora UJ, w których dr Dziga był wykonawcą lub kierownikiem. Jego badania dotyczyły zarówno dynamiki rozwoju toksyno-twórczych sinic w zbiornikach wodnych, toksycznego działania hepatotoksycznej mikrocytyny-LR na organizmy żywe, w tym na ultrastrukturę i funkcjonowanie keranocytów skóry ludzkiej i hamujące działanie mikrocytyny - LR na procesy regeneracyjne w komórkach, jak również interakcji toksyno-twórczych sinic z roślinami wodnymi, wskazujących ambiwalentne efekty w postaci zahamowania rozwoju sinic z rodzaju *Microcystis* przez fenole roślinne w wyniku zahamowania procesu fotosyntezy oraz jednoczesne działanie powodujące lizę komórek i uwalnianie niebezpiecznych cyjanotoksyn do środowiska wodnego. Dr Dziga stwierdził także, że toksyczne szczepy *Microcystis* uwalniające szereg wydzielanych pozakomórkowo enzymów takich jak alkaliczna fosfataza, glikozydaza i aminopeptydaza leucynowa przyczyniają się do zwiększenia puli mineralnych związków (pochodzących z rozkładu związków organicznych), które wzmagają masowy rozwój sinic w wodach.

Znaczny postęp w rozwoju naukowym dr D. Dzigi dokonał się w wyniku rocznego pobytu stypendialnego i kilku krótkoterminowych (w latach 2007-2016) w znanym ośrodku naukowym Finlandii - w Zakładzie Chemii i Farmacji, Abo Akademii University w Turku, gdzie dzięki współpracy z wybitnymi specjalistami w zakresie analizy cyjanotoksyn (np. prof. J. Meriluoto) poszerzał swoją wiedzę i kompetencje.

Jako autor i kierownik 5 projektów (w tym trzech finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki i jednym przez Centre for International Mobility w Finlandii) dr D. Dziga zajął się w szerszym zakresie badaniami nad procesami bakteryjnej dekompozycji mikrocytyn, a następnie cytotoksycznej cylindropermopsyny produkowanej przez nitkowate sinice takie jak *Aphanizomenon gracile*, *Cylindropermopsis raciborskii*,

rozwijające się coraz powszechniej w wodach powierzchniowych świata (w tym Polski). Podjął również próbę opracowania technologii opartej na zastosowaniu genetycznie modyfikowanego szczepu bakterii *E. coli* unieruchamianych w alginacie i wykazał ich wysoką efektywność w usuwaniu mikrocystyn z wody. Zajął się również poszukiwaniem oraz identyfikacją, za pomocą metod molekularnych, szczepów bakterii naturalnie występujących w wodach i zdolnych do biodegradacji cylindrospermopsyny. Określił warunki środowiskowe optymalne dla tych procesów. Habilitant kontynuuje te obiecujące prace.

Tak więc te szeroko zakrojone badania prowadzone przez dr D. **Dzige świadczą o dużej aktywności i wnikliwości habilitanta oraz noszą nowatorski, aplikacyjny charakter. Prace autorstwa lub współautorstwa dr D. Dzigy opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy w zakresie tematyki badań, które podejmował, ze szczególnym uwzględnieniem problematyki związanej z procesami degradacji toksycznych metabolitów sinic.**

Na uwagę zasługuje fakt, że dr Dziga realizował swoje badania w ramach krajowych i międzynarodowych projektów, w których pełnił kierowniczą rolę (lata 2005-nadal). **Świadczy to o samodzielności habilitanta, aktywności w poszukiwaniu funduszy na badania, jak również o umiejętności organizowania zespołów badawczych.** Dorobek naukowy habilitanta powstał bowiem w ramach współpracy z kilkoma krajowymi ośrodkami naukowymi takimi jak: Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu Jana Kochanowskiego Kielcach, Zakład Hydrobiologii UAM w Poznaniu, Zakład Ekologii Stosowanej Uniwersytetu Łódzkiego oraz długoletniej współpracy z naukowcami z Zakładu Biochemii i Farmacji Abo Akademi University w Turku. Na swoim koncie habilitant posiada również 2 publikacje popularno-naukowe (w czasopiśmie *Wszechświat* oraz na stronie internetowej UJ), a także współautorstwo w powstającej obecnie (w ramach europejskiego projektu CyanoCost) książce „Water Treatment for Purification from Cyanobacteria and Cyanotoxins”.

3. Ocena współpracy międzynarodowej, dorobku dydaktycznego i organizacyjnego.

Dr Dariusz Dziga **jest badaczem aktywnym na arenie międzynarodowej,** realizującym część swoich badań zagranicą (Abo Akademi University w Turku), dzięki nawiązaniu kontaktów i starań o fundusze. **Habilitant prezentował wyniki swojej pracy na wielu międzynarodowych konferencjach naukowych,** organizowanych między innymi w Norwegii, Finlandii, Danii, Republice Południowej Afryki, Hiszpanii, Bułgarii oraz w Polsce.

Recenzował prace (10) innych autorów dla prestiżowych międzynarodowych czasopism takich jak: **Chemosphere, Enzyme and Microbial Technology, Toxicon, Environmental Toxicology, Applied and Environmental Microbiology** i innych, co świadczy o uznaniu dla wiedzy i dokonań dr Dzigi. Angażował się również w prace europejskich projektów : CyanoCOST i European Multilake Survey.

O uznaniu dla dorobku naukowego i doświadczenia dr D. Dzigi świadczy zaproszenia do pełnienia funkcji recenzenta projektów badawczych w Małopolskim Funduszu Stypendialnym dla doktorantów oraz do zespołu ekspertów Narodowego Centrum Nauki.

Dr Dariusz Dziga ma wieloletnie doświadczenie i osiągnięcia dydaktyczne. Od początku swej pracy na Uniwersytecie Jagiellońskim prowadził zajęcia laboratoryjne, a następnie również wykłady z biochemii, fizjologii roślin, ochrony środowiska i ochrony przyrody na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, a także przez pewien czas (w 2012 r.) zajęcia przyrodnicze w klasach I-III w Szkole Podstawowej w Myślenicach. Prowadził również przez 6 lat zajęcia dla studentów w ramach wyróżnionego autorskiego kursu „Biotechnologiczne metody produkcji paliw”. Ponadto, pełnił funkcję opiekuna naukowego lub promotora 2 prac licencjackich i 10 magisterskich, a także opiekuna naukowego w Studenckim Projekcie Badawczym w ramach programu KNOW na macierzystym wydziale. **Brał udział w projekcie Ministerstwa Pracy i Polityki społecznej dotyczące „opracowania i upowszechniania krajowych standardów kwalifikacji zawodowych”.** Był aktywny w upowszechnianiu wiedzy biorąc aktywny udział (w latach 2004-2006) w Festiwalu Nauki w Krakowie.

W ramach osiągnięć organizacyjnych Dr Dzigi można wymienić jego aktywność z początków kariery zawodowej- tj udział w organizowaniu Szkoły Zimowej Zakładu Biochemii Ogólnej , pracę w komisjach rekrutacyjnych, czy zaangażowanie w wyborach rektorskich w charakterze elektora. Dr Dziga jest członkiem chóru akademickiego pracującego na rzecz macierzystej uczelni.

4. Ocena „osiągnięcia naukowego”

Dr Dariusz Dziga przedstawił jako swoje „osiągnięcie naukowe” spójny tematycznie cykl 6 prac zatytułowany „ Mikrobiologiczna degradacja toksyn sinicowych mikrocystyn”, które opublikowane zostały w okresie 4 lat (2012-2015). **Sklada się nań 5 prac oryginalnych i praca przeglądowa, opublikowanych w wysoko punktowanych czasopismach z listy JCR takich jak Toxicon, Toxins and Chemical Research in**

Toxicology. Sumaryczny *impact factor* tych publikacji jest wynosi 19,438, co świadczy o ich wysokim poziomie merytorycznym. Wszystkie prace są wielo-autorskie, przy czym habilitant w 5 z nich jest pierwszym autorem, a w jednej – drugim. **Średni udział habilitanta w ich powstaniu wynosi 60 %, co wskazuje na wiodącą rolę habilitanta w ich powstaniu.**

Problematyka poruszana w pracach składających się na „osiągnięcie habilitacyjne” jest bardzo aktualna ze względu na ogólnoswiatowy problem nadmiernego rozwoju toksyno-twórczych sinic powodującego zaburzenia w funkcjonowaniu ekosystemów wodnych oraz stwarzającego poważne zagrożenie w wodach wykorzystywanych przez człowieka do celów konsumpcyjnych i rekreacyjnych. Większość z tych szeroko zakrojonych prac habilitanta dotyczy szczegółowego rozpoznania genetycznych i biochemicznych mechanizmów dekompozycji toksycznych mikrocytyn (MCs) przez bakterie posiadające klaster genowy *mlr*, w celu wyeliminowania ich ze środowiska. Habilitant posługując się nowoczesnymi metodami biologii molekularnej oraz enzymologii wskazał m. innymi, które aminokwasy pełnią kluczową rolę w aktywności enzymatycznego białka MlrA bakterii biorącego udział w degradacji mikrocytyn, określił warunki optymalne dla aktywności białka MlrA i kinetykę pierwszego etapu degradacji, tj. linearyzacji mikrocytyny –LR, zweryfikował centrum aktywne białka MlrB, stwierdził, że białko MlrC jest metaloproteiną zawierającą cynk w centrum aktywnym. Habilitant przedstawił również nowe, niezwykle ciekawe informacje dotyczące udziału białek MlrA, MlrB i MlrC w poszczególnych etapach rozkładu mikrocytyn. Wykazał między innymi, że MlrA katalizuje pierwszy etap czyli linearyzację mikrocytyn niezależnie od ich strukturalnego wariantu, a białka MlrB i MlrC mogą kontynuować równoległe hydrolizę wiązań peptydowych w liniowych cząstkach MCs. Wykazał także, że wszystkie trzy białka mogą brać udział w dalszych etapach dekompozycji mikrocytyn. Wykazał specyficzność substratową białek MlrA i MlrC związaną z obecnością aminokwasu Adda, decydującego o toksyczności mikrocytyn oraz że tetrapeptyd powstały w wyniku degradacji MCs nie jest rozkładany przez żaden z enzymów klastera *mlr*. Habilitant stwierdził ponadto, że u bakterii probiotycznych (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), w odróżnieniu od bakterii takich jak *Sphingomonas* zasiedlających zbiorniki wodne, nie występuje transport mikrocytyn do wnętrza ich komórek i że w związku z tym, za degradację tych cyjanotoksyn odpowiedzialne są proteiny związane z ścianami komórkowymi tych bakterii. **Prace dr Dzigi wyraźnie wskazują, że w naturze mogą istnieć alternatywne szlaki dekompozycji mikrocytyn.** Nowatorska próba praktycznego wykorzystania procesu bakteryjnej degradacji mikrocytyn do poziomu

rekomendowanego przez WHO (1 ug/l) w wodach wykorzystywanych przez człowieka wykazała, że immobilizowane szczepy bakterii posiadających rekombinowane białko MlrA były wysoce efektywne w usuwaniu toksyn. Zaproponowany bioreaktor wykazywał wysoką efektywność lecz niezbyt długą stabilność systemu, co wskazuje na znaczny potencjał w jego zastosowaniu jako uzupełniającej lub alternatywnej metody do usuwania mikrocyzyn, lecz wymaga dalszych prac badawczych.

Podsumowując stwierdzam, że nowe dane oraz informacje przedstawione w pracach wchodzących w skład „osiągnięcia habilitacyjnego” w istotnym stopniu poszerzają dotychczasowy stan wiedzy na temat mechanizmów biodegradacji metabolitów wtórnych sinic oraz praktycznego zastosowania tych procesów w celu zmniejszenia zagrożenia mikrocyzynami – toksynami produkowanymi w przez szereg powszechnie występujących w wodach śródlądowych gatunków sinic, należących do rodzajów *Microcystis*, *Dolichospermum*, *Planktothrix*.

5. Wnioski końcowe

Przedstawione mi do oceny „osiągnięcie naukowe”, pozostały dorobek naukowy oraz dydaktyczny i organizacyjny dr Dariusza Dzigi spełniają wymogi zawarte w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 ze zm.) i wobec powyższego wyrażam pozytywną opinię dotyczącą nadania mu stopnia doktora habilitowanego nauk biologicznych, w dyscyplinie biochemia.

B. Papiłi-Skowrońska