IN MARI VIA CUA
University of Gdansk, Institute of Oceanography, 81-378 Gdynia, Al. Marszałka Piłsudskiego 46

Prof. dr hab. Hanna Mazur-Marzec
Zakład Biotechnologii Morskiej
Wydział Oceanografii i Geografii
Uniwersytet Gdański
e-mail: biohm@ug.edu.pl

Gdańsk, 14.10.2016

**Ocena osiągnięcia naukowego**
**pt. „*Mikrobiologiczna degradacja toksyn sinicowych mikrocystyn*"**
**oraz innej aktywności naukowo-badawczej, dorobku dydaktycznego,**
**popularyzatorskiego i współpracy międzynarodowej**
**Pana dr Dariusza Dzigi ubiegającego się o nadanie stopnia doktora habilitowanego**
**nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia**

Dr Dariusz Dziga jest absolwentem Uniwersytetu Jagiellońskiego (UJ), gdzie na kierunku biologia wykonał pracę magisterską w zakresie biologii molekularnej. Na tej samej uczelni, w 2001 r. uzyskał stopień doktora nauk biologicznych, specjalność – biochemia. Obecnie, dr Dziga zatrudniony jest w Zakładzie Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin UJ na stanowisku adiunkta.

**Ocena osiągnięcia naukowego**

Osiągnięciem naukowym dr Dariusza Dzigi stanowiącym podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego jest cykl 6 publikacji: 5 oryginalnych prac i jedna praca przeglądowa. Dotyczą one problematyki mikrobiologicznej degradacji cyjanotoksyn z grupy mikrocystyn. Pierwsza chronologicznie praca stanowiąca element dorobku naukowego „*Characterization of microcystin-LR removal process in the presence of probiotic bacteria*" poświęcona jest procesowi degradacji mikrocystyny-LR (MC-LR) przez dwa szczepy z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* oraz jeden szczep z gatunku *Bifidobacterium lactic.* Aktywność enzymatyczna tych probiotycznych bakterii względem MC-LR wykazana została już wcześniej przez jednego z współautorów publikacji (Nybom i wsp. 2008). Natomiast w załączonej pracy wykazano jednoznacznie, że za proces degradacji toksyny odpowiedzialne są proteinazy związane ze ścianą komórkową. Zastosowanie znakowanej radioaktywnie cząsteczki MC-LR potwierdziło, że toksyna ta nie jest transportowana do komórek testowanych bakterii. Spadkowi aktywności proteinaz (po dodaniu inhibitora) towarzyszyło zahamowanie procesu degradacji MC-LR, co dodatkowo potwierdziło rolę tych enzymów. W pracy wykazano jednocześnie, że aktywność proteinaz wzrastała po dodaniu glukozy, co sugeruje zwiększone zapotrzebowanie energetyczne bakterii. Ważną obserwacją jest również spadek toksyczności MC-LR w wyniku procesu biodegradacji przez bakterie probiotyczne. Zmianę aktywności produktu degradacji wykazano w teście z zastosowaniem fosfatazy białkowej PP1. W pracy zasugerowano, że badany proces biodegradacji zachodzi na drodze innych reakcji niż wcześniej opisano.

Istotnym elementem dorobku Kandydata jest również publikacja pt. „*Heterologous expression and characterization of microcystinase*", w której opisano nowatorski sposób pozyskiwania białka enzymatycznego MrlA, uczestniczącego w biodegradacji mikrocystyn (poprzez linearyzację cząsteczki). Co istotne, przed ekspresją tej mikrocystynazy przeprowadzono weryfikację sekwencji genów *mlr*A, kodujących enzym. Klonowanie genu do wektor ekspresyjnego i następnie wprowadzenie powstałego konstruktu do komórki gospodarza *E. coli* umożliwiło pozyskanie większej ilości białka, które zostało częściowo oczyszczone a jego właściwości (w tym kinetyka reakcji otwarcia układu cyklicznego MC-LR) zostały scharakteryzowane. Zmodyfikowane komórki *E. coli* okazały się znacznie efektywniejsze w biodegradacji MC-LR niż szczep *Sphingomonas ACM-3692*, który jest naturalnym źródłem enzymu. Ponadto, stwierdzono, że w komórkach *Sphingomonas,* MrlA występuje w przestrzeni periplazmatycznej, natomiast u *E. coli* prawdopodobnie enzym ten występuje w innym miejscu. Badania prowadzone w tej pracy potwierdziły, iż MrlA jest metalloproteazą.

Wyniki dalszych prac nad rolą enzymów uczestniczących w procesie degradacji mikrocystyn przedstawiono w publikacji „*Verification of the role of MlrC in microcystin biodegradation by studies using heterologously expressed enyzme*". Tym razem przedmiotem zainteresowania było białko MlrC, które hydrolizuje liniową formę MC-LR. Podobnie jak w poprzedniej pracy, przeprowadzono klonowanie genu *mlr*C pozyskanego z genomowego DNA *Sphingomonas ACM-369.* Po oczyszczeniu białka produkowanego przez *E. coli* BL21(D3) oceniono jego aktywność. Ważnym wynikiem doświadczeń przeprowadzonego z zastosowaniem metod chemicznych i molekularnych było wykazanie, że otrzymany enzym powoduje rozpad liniowych wariantów mikrocystyn poprzez hydrolizę wiązania Adda-Glu. W wyniku tej reakcji powstaje wolna reszta Adda. Natomiast enzym ten nie powoduje rozpadu formy cyklicznej tych cząsteczek. Tym samym potwierdzono rolę, jaką MrlC pełni w procesie degradacji mikrocystyn. Również w tym wypadku wykazano, że otrzymane produkty reakcji rozpadu mikrocystyn są nietoksyczne.

Własne doświadczenie i wiedzę zdobytą w trakcie realizowania prac nad biodegradacją mikrocystyn dr Dziga wykorzystał do napisania pracy przeglądowej „*Microbial degradation of microcystin*". W pracy tej, w sposób szczegółowy i wyczerpujący scharakteryzowano mikroorganizmy (głównie bakterie) zdolne do produkcji enzymów rozkładających te toksyny, opisano rolę poszczególnych białek uczestniczących w tym procesie oraz jego przebieg i wydajność (w zdefiniowanych warunkach laboratoryjnych). Poruszono również ciekawą kwestię ekspresji genów *mlr*A, przeprowadzono dyskusję nad potencjalnym znaczenie MC dla bakterii i opisano problemy metodyczne związane z badaniami nad biodegradacją związków. Wskazano również na pewne luki w naszej wiedzy o przebiegu procesu rozkładu mikrocystyn w środowisku naturalnym – m.in. możliwość udziału innych białek niż Mlr. Jest to bardzo cenna praca dla wszystkich osób zainteresowanych tematem biodegradacji MC. Liczba cytowani artykułu opublikowanego w 2013 r wynosi 19 (20161013).

Doświadczenia przedstawione w publikacji „*Bioreactor study employing bacteria with enhanced activity toward cyanobacterial toxins microcystins*" miały charakter aplikacyjny. Ich celem było wykorzystanie immobilizowanych bakterii *E. coli* do usuwania mikrocystyn w zaprojektowanym bioreaktorze. Bakterie te zostały wcześniej zmodyfikowane poprzez wprowadzenie aktywnego genu *mlr*A, a ich zdolność do rozkładu MC-LR była znacznie wyższa niż w przypadku *Sphingomonas* AMC-3962. Optymalizowano przebieg procesu biodegradacji poprzez stosowanie otwartego i zamkniętego obiegu wody, różnej długości kolumn wypełnionych żelem alginianowym, różnego stężenia toksyny oraz różnej

temperatury. Choć sami autorzy wskazują na konieczność dalszej pracy nad systemem, zwłaszcza po jego skalowaniu do rzeczywistych warunków funkcjonowania, to uzyskane parametry (wydajność i stabilność) są bardzo obiecujące. Może mieć on szczególnie zastosowanie w sytuacji, gdy zaistnieje potrzeba szybkiego usunięcia większej ilości toksyn np. w stawach rybnych lub zbiornikach wody przeznaczonej do nawadniania pól. W pracy tej udało się również zlokalizować występowanie białka MlrA w komórce *E. coli*. Jak sądzono wcześniej, głównym miejscem występowania tego białka nie była periplazma, ale cytozol. Wynik ten potwierdził wcześniej wysuniętą hipotezę, że w stosowanym układzie doświadczalnym tylko część enzymu produkowanego przez te bakterie jest wykorzystana w degradacji MC-LR.

Ostatnia praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego to „*Characterization of enzymatic activity of MlrB and MlrC proteins involved in bacterial degradation of cyanotoxins microcystins*", weryfikuje istniejącą wiedzę na temat sekwencji *mlr*B, struktury centrum aktywnego MlrB oraz szczegółowo opisuje udziału poszczególnych enzymów w procesie rozkładu MC-LR. W tym celu zastosowano m. in. inhibitory tych enzymów. Stwierdzono, że MlrB hydrolizuje wiązanie pomiędzy pierwszą i drugą resztą aminokwasową w liniowej formie różnych mikrocystyn, a MlrC prawdopodobnie hydrolizuje tylko wiązanie peptydowe Adda-Glu w liniowych hepta- i tertrapeptydach powstałych z rozpadu mikrocystyn. Heksapeptyd jest dalej rozkładany przez MlrA i MlrB. Zwrócono uwagę na specyficzność substratową opisywanych białek Mlr. Ponadto, dr Dziga wysunął hipotezę, że czynnikiem determinującym aktywność mikrocystynazy MlrA jest obecność Adda. W odróżnieniu od autorów, którzy wcześniej opisywali drogę biodegradacji mikrocystyn, Habilitant w swoich badaniach stosował zarówno metody chemiczne jak i molekularne.

Podsumowując, przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe tworzy spójną całość. Wszystkie prace wchodzące w jego skład są interesujące, często pionierskie, zawierające istotny element nowości; znacznie poszerzają wiedzę o procesie biodegradacji mikrocystyn, właściwościach i roli białek w nim uczestniczących, drodze rozkładu tych związków. Wskazują również na możliwość praktycznego zastosowania bakterii z rekombinowanym białkiem MlrA. Poza jedną publikacją (A), dr D. Dziga jest pierwszym autorem prac i jego udział w ich realizacji wynosi 60-70%. Jest to znaczący udział, zważywszy że z wyjątkiem jednej pracy (E), liczba współautorów wynosi 6-7. Treść publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe świadczy o pełnej dojrzałości Habilitanta do samodzielnej pracy naukowej. Prace te zostały opublikowane w latach 2012-2016, w czasopismach o łącznej wartość IF 19.22. Ich łączna cytowalność wynosi 32 (20161013).

**Ocena dorobku naukowo-badawczego**

Poza osiągnięciem naukowym stanowiącym podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego (6 publikacji), Dr Dariusz Dziga ma w swoim dorobku dwadzieścia publikacji. W ich skład wchodzą dwie prace w czasopismach nieindeksowanych, dziewięć w czasopismach o wartości IF powyżej 2 i cztery w czasopismach o wartości IF powyżej 3. Zdecydowana większość tych prac (wykonana po uzyskaniu stopnia doktora) związana jest z tematyką toksycznych metabolitów cyjanobakterii, głównie mikrocystyn. We wczesnym etapie tych badań Habilitant uczestniczył w projekcie KBN (2004-2006) dotyczącym toksyczności MC-LR ocenianej na poziomie subkomórkowym. Wymiernym efektem tego projektu są trzy publikacje, której współautorami są wybitni specjaliści w tym zakresie, prof. W.W. Carmichael z USA oraz prof. Anna Lankoff (PAN).

Zapewne grant otrzymany w 2005 roku (Rektorski Fundusz Stypendialny) zapoczątkowała i stworzył możliwość prowadzenia prac nad procesem biodegradacji mikrocystyn. Z przedstawionych materiałów wynika, że temat ten stał się wiodącym tematem badań prowadzonych od tego czasu przez dr Dzigę. W latach 2005-2018, Habilitant był kierownikiem 6 grantów dotyczących różnych aspektów degradacji cyjanotoksyn przez bakterie. Owocem badań prowadzonych w ramach tych projektów jest w chwili obecnej 11 opublikowanych prac, w których Habilitant jest z reguły pierwszym autorem.

Poza procesem degradacji mikrocystyn, dr Dziga zajmował się również bakteryjnym rozkładem cylindrospermopsyny (CYN). Stwierdzono, że toksyna ta jest rozkładana przez bakterie *Aeromonas* sp. Co niezwykle ciekawe, obecność cylindrospermopsyny stymulowała wzrost tego szczepu. Praca ta w pewnym stopniu uzupełnia niewielką obecnie wiedzę o mikrobiologicznej degradacji CYN. Habilitant uczestniczył również w rzadko w Polsce prowadzonych badaniach środowiskowych nad występowaniem CYN. Toksyna ta została wykryta w wielkopolskich jeziorach (we współpracy z Uniwersytetem im. Adama Mickiewicza w Poznaniu), a jej prawdopodobnym źródłem są cyajnobakterie z rodzaju *Aphanizomenon*.

Innym tematem prac realizowanych z udziałem Habilitanta jest wpływ MC-LR na komórki naskórka. Dotychczas, związek ten był przede wszystkim badany pod kątem działania na komórki wątroby. Poznanie działania MC-LR na komórki naskórka może być ważne i interesujące ze względu na jedną z głównych dróg ekspozycji ludzi na działanie tej toksyny – czyli w czasie kąpieli w wodzie, w której występują cyjanobakterie produkujące MC-LR. Z prowadzonych badań wynika, że negatywne efekty działania MC-LR na keratynocyty, w postaci m.in. zniszczenia cytoszkieletu komórek, odwracalnego zahamowania proliferacji, występowały przy dłuższej ekspozycji i były zależne od stężenia toksyn.

Sumaryczny IF publikacji dr D. Dzigi wynosi 57. Według danych bazy Web of Science, prace Habilitanta były dotychczas cytowane 297 razy (266 bez autocytowań) i ich cytowalność systematycznie wzrasta. W ostatnich latach było to 30-40 cytowań/rok. W obecnym roku liczba ta wynosi już 43, co świadczy o coraz większym zainteresowaniu środowiska naukowego wynikami pracy Habilitanta. Powyższe parametry bibliometryczne dr Dzigi, wraz z osiągniętą wartością indeksu h = 9, wskazują na jego znaczną i skuteczną aktywność naukową.

Od 2000 r. dr D. Dziga uczestniczył w sumie w 10 projektach naukowych, z czego w 7 pełnił funkcję kierownika projektu. Pięć z tych projektów to granty KBN lub NCN. Habilitant uzyskał również grant Centre for International Mobility z Abo Akademi w Turku (Finlandia), który umożliwił mu odbycie rocznego stażu naukowego na tej uczelni, w laboratorium prof. Jussi Meriluotu, wybitnego eksperta w zakresie analiz chemicznych cyjanotoksyn. W laboratorium tym Habilitant odbył jeszcze 3 krótkie staże. Współpraca z prof. Meriluoto zaowocowała dotychczas 5 wspólnymi publikacjami w czasopismach o wysokiej wartości IF. Można więc podsumować, że Habilitant wykazał się dużą skutecznością w zdobywaniu funduszy na realizację badań, a zdobyte środki efektywnie wykorzystał, co potwierdza dorobek publikacyjny.

Dr Dziga uczestniczył w 29 konferencjach i warsztatach naukowych. W 16 przypadkach były to postery a w 7 referaty wygłoszone przez Habilitanta, z czego 4 w trakcie konferencji odbywających się zagranicą. Nie jest to dużo, zważywszy na posiadany dorobek

naukowy. Możliwe, że Habilitant przyjął publikacje za główną drogę upowszechniania wyników swoich badań. Niestety, na podstawie otrzymanych materiałów nie we wszystkich przypadkach wiadomo, które konferencje miały charakter międzynarodowy. Tematyka wystąpień konferencyjnych pokrywa się z tematyką badań opisanych w publikacjach. Aktywność zawodowa dr Dzigi przejawia się również w recenzowaniu prac dla redakcji czasopism międzynarodowych (13 recenzji) oraz projektów badawczych. Habilitant został też zaangażowany do pracy Zespołu Ekspertów NCN w panelu tematycznym NZ9.

**Ocena dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego oraz współpracy zagranicznej**

Dr Dariusz Dziga prowadził ćwiczenia laboratoryjne (1997-2000) z biochemii oraz fizjologii rośli (2001-2015). Największym jednak osiągnięciem dydaktycznym było opracowanie autorskiego programu kursu i prowadzenie zajęć, wykładów i ćwiczeń laboratoryjnych (2010-2015) z *biotechnologicznych metod produkcji paliwa.* Za tę pracę Habilitant otrzymał wyróżnienie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Z dostarczonych materiałów nie wynika, jakie zajęcia obecnie prowadzi dr Dziga, zatrudniony jako adiunkt w Uniwersytecie Jagiellońskim.

Elementem dorobku dydaktycznego Habilitanta jest też opieka nad pracami licencjackimi i magisterskimi – w sumie 12 ukończonych i obronionych prac. Należy zaznaczyć, że wyniki tych prac zostały wykorzystane w 7 publikacjach naukowych. Dr Dziga pełni też funkcję opiekuna naukowego studenckiego projektu realizowanego w ramach KNOW.

W ramach działalności organizacyjnej i popularyzatorskiej, dr Dziga uczestniczył aktywnie w kilku edycjach Festiwali Nauki w Krakowie. Organizował i prowadził zajęcia dla młodzieży popularyzując wiedzę z zakresu przyrody i biotechnologii. Habilitant jest też autorem dwóch artykułów popularnonaukowych opublikowanych w czasopiśmie Wszechświat oraz na strunie UJ.

Wartym podkreślenia jest aktywny udział Habilitanta w międzynarodowym projekcie CYANOCOST (akcja COST ES1105). Choć dr Dziga nie jest oficjalnym delegatem kraju w tej akcji, to jednak uczestniczył w spotkaniach Komitetu Zarządzającego, jest też jednym z autorów podręcznika pisanego przez uczestników projektu „*Water treatment for purification from cyanobacteria and cyanotoxins*". Był też zaangażowany w część doświadczeń prowadzonych w ramach międzynarodowego eksperymentu European Multi Lake Survey, który odbył się w 2015 r. na zasadzie współpracy dwóch akcji COST: CYANOCOST i NETLAKE. Ponadto, w ramach współpracy zagranicznej dr Dziga prowadził badania ze środków uzyskanych z Abo Akademi w Turku, uczestniczył w badaniach z udziałem prof. W.W Carmichaela oraz prof. J. Meriluoto, o czym wspomniano wyżej.

**Podsumowanie**

Najciekawszym i najcenniejszym elementem dorobku naukowego dr Dariusza Dzigi są prace dotyczące procesu mikrobiologicznej degradacji cyjanotoksyn, zawarte w osiągnięciu naukowym. W tym zakresie, Habilitant osiągnął wysoką pozycję wśród badaczy zajmujących się wymienioną tematyką. Udokumentował również swoją dojrzałość, jako samodzielnego naukowca, który potrafi wykorzystać różnorodne metody badawcze do weryfikacji stawianych hipotez. Uzyskane dotychczas wyniki badań nad rolą białek uczestniczących w rozkładzie mikrocystyny MC-LR można uznać za duży sukces naukowy. Jak wynika z

przedstawionych materiałów (załącznik 1), sukces ten zachęcił Habilitanta do dalszych badań w tym zakresie.

Na podstawie analizy osiągnięcia naukowego oraz pozostałego dorobku naukowego, oceniam dorobek dr Dariusz Dziga jako oryginalny i wystarczający, aby ubiegać się o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk o biologicznych. Uwzględniając zatem kryteria określone w art. 18, ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 wraz z późniejszymi zmianami), popieram wniosek dr Dariusza Dzigi o nadanie jemu stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych.

Hanna Mazur-Marzec