

Łódź, dn. 03.06.2022 r.

dr hab. Karolina Bącela-Spychalska, prof. UŁ

Katedra Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
tel: +48 42 635 42 96
e-mail: karolina.bacela@biol.uni.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:
**Różnorodność gatunkowa Microsporidia
u wybranych stawonogów hematofagicznych
i wpływ obecności mikrosporydiów na mikrobiom gospodarza**

wykonanej przez **mgra Artura Trzebnego**

w Laboratorium Technik Biologii Molekularnej Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
pod kierunkiem dr hab. Mirosławy Dabert, prof. UAM

Tematyka i cele pracy

Przedmiotem badań są Microsporidia, obligatoryjne pasożyty wewnątrzkomórkowe wielu eukariontów, w tym stawonogów hematofagicznych (tu komary i kleszcze (Ixodidae), do których to została zawężona tematyka badań. Stawonogi te są jednymi z najważniejszych wektorów czynników chorobotwórczych dla wielu kręgowców. Celem recenzowanej pracy doktorskiej była próba odpowiedzi na pytania: (1) jaka jest różnorodność gatunkowa mikrosporydiów u w/w gospodarzy; (2) czy mikrosporydia współwystępujące u tego samego gospodarza oddziałują na siebie; oraz (3) czy infekcja mikrosporydiami wpływa na mikrobiom gospodarza. Faktycznie, ogromna różnorodność tych pasożytów powoduje, że przetestowanie pod tym kątem kolejnej grupy taksonomicznej pozwala na poznanie kolejnych gatunków tych pasożytów.

Struktura rozprawy, jej ocena formalna i merytoryczna

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska składa się z kilku rozdziałów stanowiących wstęp do pracy (streszczenie, autoreferat i spis publikacji w jęz. polskim i angielskim) oraz 4 dalszych rozdziałów: 3 opublikowanych prac naukowych w Molecular Ecology Resources, Microbial Ecology, Parasites & Vectors i jednej pracy przedłożonej do recenzji w Scientific Reports. W każdym z artykułów doktorant pełnił wiodącą rolę (60%, 75%, 70% i 60%) co potwierdzają oświadczenia wszystkich autorów. W artykule nr 1 doktorant podjął się trudnego i bardzo ważnego zadania zaprojektowania starterów, które pozwolą na wykrywanie i identyfikację mikrosporydiów z użyciem metabarkodowania. Trzeba podkreślić, że użycie tej metody w bardzo prosty sposób pozwala na wykrywanie ko-infekcji, co przy tradycyjnych metodach sekwencjonowania „sangerowskiego” jest praktycznie niemożliwe (bez uprzedniego klonowania i wydłużonej metodyki identyfikacji). Z drugiej strony, trzeba pamiętać, że ten króciutki fragment SSU rDNA niesie ze sobą dość dyskusyjną rozdzielczość na poziomie gatunku

i zapewne w wielu sytuacjach nie jest wystarczającym narzędziem. Mimo to, uważam, że zaprojektowane narzędzie jest bardzo cenne i pomoże zapewne rozszerzyć badania nad różnorodnością mikrosporydiów, bo pozwala za pomocą jednego sekwencjonowania uzyskać nie tylko informację o ko-infekcjach, ale w innym kontekście, pozwala na poznanie różnorodności mikrosporydiów całych zespołów z podziałem na gatunki żywicielskie. Praca jest już opublikowana, po recenzjach, bardzo dobrze napisana i z bardzo dobrze dobranymi metodami, jednak mam pewne bardzo drobne uwagi. Trudno mi się zgodzić ze stwierdzeniem, że „Microsporidia are generally studied as zoonotic and/or waterborne agents of human disease or veterinary parasites”. Uważam, że ogromna część wiedzy nt. taksonomii, biologii i ekologii mikrosporydiów pochodzi z badań nad pasożytami ekologicznie ważnych żywicieli i kluczowych dla funkcjonowania ekosystemów (np. skorupiaki), czy ważnych gospodarczo (zapylacze, pszczoła miodna). Mam również pytanie o to jaki dystans genetyczny był obserwowany we fragmencie v5 SSU rDNA pomiędzy poszczególnymi gatunkami mikrosporydiów wybranych przy projektowaniu starterów? I jaka jest długość uzyskanego amplikonu (v5)?

W kolejnej pracy postawiono sobie za zadanie przetestowanie polikseniczności mikrosporidiów, poprzez zbadanie różnorodności gatunkowej pasożytów infekujących kilka gatunków komarów występujących na niewielkim obszarze w Polsce. Dodatkowo uzyskano ciekawe wyniki pokazujące jak częsta jest ko-infekcja i potwierdzenie użyteczności metody metabarkodowania w przypadku badania różnorodności tych pasożytów. Praca napisana jest dobrym językiem, metody dobrano prawidłowo. Pewien niedosyt pozostawia dyskusja, w której autorzy nie pokusili się o próbę interpretacji niektórych danych, np. stwierdzenia sekwencji identycznej do uzyskanej ze skorupiaka występującego w J. Bajkał (*Microsporidium* sp BLAT1). Niestety, może to być właśnie efekt za niskiej rozdzielczości taksonomicznej wybranego markera. Druga sugestia jaka mi się rodzi, to próba skanowania innych organizmów z obszaru łowienia komarów do analiz, aby stwierdzić, czy zidentyfikowane mikrosporydia nie zakażają jeszcze innych grup taksonomicznych, nie tylko komary. Oczywiście uwaga ta nie jest uwagą krytyczną, raczej sugestią na dalszy kierunek badań.

Trzecią pracę wchodzącą w skład przedłożonej dysertacji, oceniam wysoko. Jest to znaczący wkład w poznanie zmian w składzie mikrobiomów związanych z infekcjami mikrosporydiami. Niezmiernie ważne jest holistyczne postrzeganie organizmów i ich interakcji w kontekście symbiomów, a nie tylko interakcji żywiciel-pasożyt. Ciekawym wynikiem jest wykazanie występowania kilku gatunków bakterii tylko u zakażonych mikrosporydiami osobników. Wykazano również, że mikrobiota komarów zakażonych mikrosporydiami charakteryzowała się zdolnością biosyntezy antybiotyków z grup ansamycyn i wankomycyn oraz wyższą aktywnością szlaku pentozofosforanowego. Wyniki te wskazują, że mikrosporydia mogą wpływać na szlaki metaboliczne mikrobiomu żywiciela poprzez zwiększoną syntezę nukleotydów, a tym samym zwiększania potencjału do importu ATP oraz nukleotydów. Wysoko oceniam dobór metod i sposób przygotowania publikacji.

W czwartej publikacji, doktorant spróbował ocenić rolę kleszczy jako nosicieli zoonotycznych mikrosporydiów i ich generalny potencjał do pełnienia roli żywiciela dla tej grupy pasożytów. Badania te potwierdziły wcześniejsze doniesienia o niewielkiej roli kleszczy jako żywicieli mikrosporydiów, z pojedynczymi osobnikami pozytywnymi na obecność pasożytów, najprawdopodobniej pochodzących z krwi pobranej przez kleszcze od psów. Tylko jeden gatunek mikrosporydium należący do rodzaju *Endoreticulatus*, o prevalencji poniżej 0,8%, został zidentyfikowany w całym materiale.

Uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska p. Trzebnego jest bardzo ważnym wkładem w poznanie nie tylko różnorodności ważnych ekologicznie pasożytów infekujących komary, ale przede wszystkim doktorant zaprojektował bardzo dobre narzędzie do poznania i identyfikacji tych pasożytów także w innych grupach. Nie możemy jednak zapominać, że nie zastępuje to prac bardziej celowanych nad taksonomią (w tym taksonomią integratywną!) tej ciekawej grupy pasożytów, a daje dobry początek do oszacowania jej bioróżnorodności w wybranej grupie żywicieli czy danego środowiska. Skupienie się także na problemie ko-infekcji żywicieli i wpływu obecności mikrosporydiów na jakość mikrobiomu jest nadal podejściem nowatorskim i wyniki badań potwierdzają coraz liczniejsze doniesienia o szerokim spektrum żywicieli wykorzystywanych w tej grupie pasożytów.

Jestem pod wrażeniem warsztatu naukowego doktoranta, swobody formułowania hipotez i celów badawczych. Jednak w autoreferacie, przyznam, określenie celu jako próby odpowiedzi na pytanie „jaka jest *faktyczna* różnorodność gatunkowa mikrosporydiów u tych gospodarzy” w mojej ocenie brzmi zbyt optymistycznie. Czy rzeczywiście doktorant na podstawie zebranego materiału mógł ocenić „faktyczną” bioróżnorodność badanych, wybranych taksonów i to jednak na dość ograniczonym obszarze geograficznym. Grupa pasożytów, którą zajął się doktorant jest niezwykle obszerna i nie dziwią pewne uproszczenia zastosowane przed doktoranta. Sugestie *apropos* niewielkich potknięć stylistycznych, czy drobne komentarze odnośnie niektórych sformułowań umieściłam bezpośrednio w tekście i przekazałam doktorantowi. Te nieliczne uwagi krytyczne w żaden sposób nie wpływają negatywnie na odbiór i pozytywną ocenę dysertacji.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgra Artura Trzebnego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) i wnioskuję do rady naukowej dyscypliny nauki biologiczne UAM o dopuszczenie MGRA ARTURA TRZEBNEGO do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

03.06.2022 r.

data sporządzenia recenzji



podpis recenzenta