

Prof. dr hab. Grzegorz Karbowski
Instytut i Muzeum Zoologii PAN
ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej pani mgr Mileny Zduniak pt. „Różnice międzyosobnicze, a pasożyty: wpływ zachowania, użytkowania przestrzeni i cech fizycznych żywiciela na liczebność ektopasożytów myszy leśnej (*Apodemus flavicollis*) (Inter-individual differences and parasites: effects of host behavior, space use, and physical traits on ectoparasite loads in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*)).

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Zoologii Systematycznej, Instytutu Biologii Środowiska, Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. Rafała Zwolaka.

I. Formalna charakterystyka rozprawy doktorskiej

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej p. mgr Mileny Zduniak „Różnice międzyosobnicze, a pasożyty: wpływ zachowania, użytkowania przestrzeni i cech fizycznych żywiciela na liczebność ektopasożytów myszy leśnej (*Apodemus flavicollis*)”, postawiono sobie za cel opis wzajemnych relacji pasożyt-żywiciel na poziomie gatunkowym i osobniczym, na przykładzie myszy (myszarki) leśnej a jej pospolitymi ektopasożytami – kleszczem pospolitym i zbiorowiskami pcheł różnych gatunków. Doktorantka podjęła się wykonać badania behawioralne, mające wykazać czy inwazje pasożytnicze mogą mieć wpływ na zachowanie gryzoni i odwrotnie, czy cechy indywidualne gryzoni mają wpływ na poziom ich infestacji. Badania mają charakter obserwacji w terenie, uzupełnione są badaniami doświadczalnymi. Cel główny miał być osiągnięty przez realizację celów szczegółowych – czy poziom infestacji pchłami i kleszczami wpływa z indywidualnych zachowań eksploracyjnych gryzoni w terenie; czy infestacje pchłami i kleszczami wpływają na indywidualne zachowania eksploracyjne gryzoni w teście otwartego pola; badania kontrolne, badanie weryfikujące otrzymane wyniki poprzez eksperymentalną redukcję pasożytów. Wyniki pracy mają więc z

założenia charakter teoretyczny, otrzymane wyniki mają znaczenie dla poszerzenia i uzupełnienia wiedzy podstawowej.

Wybór tematu badawczego uważam za trafny – autorce udało się znaleźć interesującą niszę na pograniczu badań behawioralnych a parazytologii. Tematyka wzajemnych interakcji pomiędzy pasożytem a żywicielem poruszana jest w światowej parazytologii, lecz liczące się prace są nieliczne. Wpływ pasożytów na biologię, fizjologię i zachowanie żywicieli jest bardzo powszechny w przyrodzie i szeroko znany. Jednak badania nad tym zagadnieniem są trudne rzadko prowadzone. Przyczyną jest konieczność łączenia wielu dziedzin wiedzy i badań naukowych – wiedzy z zoologii, parazytologii, fizjologii, psychologii zwierząt i opanowania właściwych im metod badawczych. Z mojego doświadczenia wynika, że nie jest to umiejętność często spotykana. Doktorantka dokonała tego – być może jeszcze w sposób nie perfekcyjny, jednak wystarczający do uzyskania ciekawych wyników i wniosków, zasługujących na publikację w pismach o zasięgu światowym.

Przedstawiona do oceny praca doktorska napisana została w języku angielskim i składa się z dwóch rozdziałów, poprzedzonych wspólnym wstępem. Wstęp zawiera wprowadzenie do tematyki, omówienie zjawiska manipulacji żywicielem przez pasożyta, wraz z przykładami. Uzupełnieniem całości są spis literatury, tabele i ryciny. Zgodnie z wymogami formalnymi zawartymi w Art. 13, p. 6 Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych (Dz. U. Nr 65, poz. 595), Autorka zamieściła streszczenie rozprawy w języku angielskim i polskim.

Rozdział pierwszy stanowi artykuł opublikowany w czasopiśmie *Parasitology Research* w roku 2023, w trybie open access. Autorka opisuje badania, w których porównała intensywność zarażenia samic i samców myszy leśnej przez pcheły i kleszcze, i przeprowadziła test statystyczny. Wynik wykazał większą intensywność infestacji kleszczami u samców niż u samic. W przypadku pcheł nie znaleziono takiej prawidłowości. Wykazany został przy tym pozytywny związek pomiędzy masą ciała a liczbą kleszczy i pcheł. W dyskusji do tej części Autorka powołała się na często przytaczaną w parazytologii prawidłowość o znaczniejszym obciążeniu samców pasożytami w porównaniu do samic. Najczęstszym tłumaczeniem jest słabsza obrona immunologiczna u samców i czynniki hormonalne. Uzyskany wynik potwierdza to twierdzenie – ale jednocześnie wykazuje, że również inne czynniki mogą taki efekt wywołać, w tym wypadku większa masa ciała.

Zgodnie z oświadczeniami promotora oraz pozostałych współautorów, udział Doktorantki będącej autorem korespondencyjnym jest w zamieszczonej pracy wiodący na etapie planowania badań, ich wykonania oraz przygotowania.

Rozdział drugi stanowią nie opublikowane jeszcze wyniki, będące logiczną kontynuacją badań opisanych w części pierwszej. Celem było opisanie wzajemnych związków pomiędzy indywidualnym zachowaniem żywiciela, a obciążeniem pasożytami. Rozdział drugi ma własny, osobny wstęp. We wstępie do części drugiej, Autorka omawia teoretycznie zjawisko wzajemnej interakcji pomiędzy pasożytem a żywicielem. Wydaje mi się, że powinna jeszcze dodać że ma ono źródło w długim związku ewolucyjnym. Zgodnie ze wspomnianą w rozprawie teorią Czerwonej Królowej, długi związek umożliwił wzajemne dostosowanie się pasożyta i żywiciela, i tym dostosowaniem można tłumaczyć wzajemne wpływy na zachowanie i biologię. Autorka napisała „certain parasites can manipulate host behavior” – poprawiłbym to zdanie na „majority of parasites can manipulate host behavior”, ponieważ zjawisko to jest znacznie częstsze niż się pozornie wydaje, i przy niewielkim ryzyku błędu można założyć, że w każdym ewolucyjnie starym związku pasożyt-żywiciel znajdzie się elementy wzajemnych wpływów i manipulacji. Omawiając to zjawisko warto przy tym wspomnieć również koncepcję fenotypu rozszerzonego. Według niej zachowania żywiciela sprzyjające pasożytom są wynikiem działania genu pasożyta na fenotyp i behavior żywiciela. W ostatecznym wniosku, konkretne prawidłowości obserwowane w związku pasożyt-żywiciel będą wypadkową ewolucyjnego efektu wyścigu zbrojeń Czerwonej Królowej w którym biorą udział geny pasożyta i żywiciela i rozszerzonego fenotypu samolubnego genu pasożyta.

Po części ogólnej, Autorka wymienia spodziewane wyniki badań, argumentując je przykładami z literatury. Hipotezy robocze zakładały że: myszy z wysokim wskaźnikiem eksploracji są bardziej podatne na spotkanie z kleszczami i wykażą wyższy poziom infestacji, natomiast pchły będą u nich mniej liczne; wysokie wskaźniki mobilności, socjalności i eksploracji w otwartym polu będą sprzyjać infestacji; osobniki z wysokim wskaźnikiem eksploracji będą miały więcej kleszczy, natomiast z wyższym wskaźnikiem socjalności więcej pcheł; obniżenie poziomu obciążenia pasożytami zwiększy poziom aktywności.

W tej części badań, oprócz samego zebrania i identyfikacji ektopasożytów, przeprowadzony został test otwartego pola, w celu uzyskania wskaźnika poziomu eksploracyjności każdego osobnika. Na podstawie liczby złapań do określonych pułapek, oznaczano wskaźnik socjalności. Badania porównawcze przeprowadzono analogicznie w roku następnym, sprawdzając zachowanie myszy po podaniu leków przeciw pasożytniczych. Uzyskane dane analizowano z użyciem testu statystycznego. Autorka wykazała pozytywną korelację między wskaźnikiem socjalności a eksploracją w otwartym polu. Kuracja przeciw pasożytnicza nie miała tutaj wpływu na wynik testu. Ta część potwierdziła tezę, że liczebność ektopasożytów wiąże się z masą ciała, a nie z płcią.

W obydwu częściach badań zastosowane zostały podobne metody, dlatego pytania i uwagi metodyczne podaję łącznie:

Uwaga odnośnie wstępu – zabrakło ogólnych informacji o biologii żywicieli, kleszczy i pcheł. Czytelnicy pracy, dostępnej potem w bibliotece, mogą ich nie znać, a znajomość cykli życiowych ektopasożytów umożliwiła zrozumienie opisanych w pracy zjawisk i odczytanych wyników. Młode postacie kleszcza pospolitego przebywają w środowisku i tam oczekują na żywiciela. Rozwój larw pcheł odbywa się w gnieździe, i tam dorosłe pchły atakują żywicieli. Te różnice w biologii ektopasożytów należy uwzględnić w analizie i tłumaczeniu zaobserwowanych różnic infestacji myszy kleszczami i pchłami. Korelują również ze stwierdzeniem, że wysoki wskaźnik eksploracji myszy wiąże się z większą infestacją kleszczami. Podobnie ma się sprawa z pchłami. Biologia pcheł, jako pasożytów gniazdowo-norowych, koreluje ze stwierdzeniem postawionym na stronie 42 „Flea abundance seems to be unrelated to the personality of the mouse”. Pojedyncze wzmianki w tekście o różnicach w cyklach życiowych kleszczy i pcheł nie wystarczają. Analogicznie, opis biologii myszy leśnej umożliwiłby czytelnikom, nie będącym specjalistami, zrozumienie myśli przewodniej rozprawy i otrzymanych wyników.

Opis metodyki też wymaga rozszerzenia. Czy była podawana przynęta do pułapek? Jeśli tak to jaka? Czy aluminiowy kolczyk może mieć wpływ na zachowanie myszy? Czy i jak często mysz go gubiła? Pytanie o kolczyk nie jest oczywiście krytyką, lecz pytaniem uzupełniającym, ponieważ nie ma praktycznie żadnej metody znakowania małych ssaków w terenie wystarczająco trwałej i nie pociągającej za sobą jakichś skutków ubocznych. Wszystkie inne stosowane metody – palczkowania, malowania znaków, wycinania wzorków na uszach czy sierści są równie niedoskonałe.

Autorka podała że ektopasożyty zbierane były z ciała gryzoni i z woreczków w których je przenoszono. Czy wybierano je również z pułapek i z przynęty? Duża liczba pcheł w nich zostaje po wyciągnięciu gryzonia, pominięcie ich może mieć wpływ na wynik.

Dlaczego kleszcze i pchły oznaczano metodą PCR? Jest to metoda kosztowna i pracochłonna, a dla celów zamierzonych w badaniu zupełnie wystarczałaby tradycyjny klucz do oznaczania i mikroskop. Margines błędu z którym należałoby się liczyć jest dopuszczalny. W województwie wielkopolskim prawdopodobieństwo znalezienia na myszach leśnych innego gatunku kleszcza niż *Ixodes ricinus* jest znikome. Przynajmniej do tej pory, bo pojawienie się na tych terenach kleszcza *Dermacentor reticulatus* w bliskiej przyszłości jest możliwe. Zresztą identyfikowanie organizmów na podstawie sekwencji nukleotydowej i analizy z użyciem

BLAST też jest obarczone ryzykiem, jeśli autor sekwencji umieszczonej w GenBanku nie dokonał należycie starannie identyfikacji organizmu. To się zdarza, i to wcale nierzadko.

Kolejny zarzut do tej części to bardzo lakoniczna wzmianka o metodyce identyfikacji gatunku metodami molekularnymi. W rozprawie doktorskiej przyjmuje się szczegółowy opis stosowanej metodyki, a wręcz podanie protokołu – bo ta część też powinna szczegółowo być oceniona przez Recenzentów.

Autorka napisała, że były oznaczane pchły. Dlaczego nigdzie nie jest podana lista gatunków? Różne gatunki pcheł różnią się biologią. Być może, opracowanie infestacji i analiza statystyczna oddzielnie dla każdego gatunku pcheł dałyby ciekawe wyniki? Pytanie jest zasadne także z tego powodu, że skład pcheł zmienia się w ciągu roku. W czerwcu dominują pchły z gatunków *Ctenophthalmus agyrtes* i *Euctenophthalmus uncinatus*, we wrześniu *Megabothris turbidus* i *Hystrichopsylla talpae*. W opisie wyników infestacji kleszczami, brakuje informacji o stadium rozwojowym – ile i na jakim etapie obserwacji było larw i nimf. Te wartości także zmieniają się sezonowo.

Analiza źródeł oparta została o 90 pozycji literatury, w języku angielskim, z nielicznymi wyjątkami są to artykuły z czasopism indeksowanych, w większości z ostatniego dziesięciolecia. Publikacje zostały dobrane starannie i zgodnie z tematyką pracy.

Konstrukcja pracy, podział na rozdziały, styl i język, szata graficzna spełniają wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Możliwym zarzutem mogła by być mała objętość – łącznie 56 stron rozprawy – tekst jest jednak rzeczowy, bez zbędnych wstawek.

Drobne uwagi:

We wstępie Autorka używa terminu „poziom zapasożycenia”. Jest to zwrot potoczny, w parazytologii używa się terminu „intensywność zarażenia”, przy tym w odniesieniu do pasożytów zewnętrznych można posłużyć się zwrotem „poziom infestacji”.

Strona 10, wiersz 6 – dla konsekwencji w nazewnictwie, powinna być podana jeszcze angielska nazwa myszy zaroślowej *A. sylvaticus* - wood mouse.

Strona 21 – Autorka podała nazwę gatunkową kleszcza *Ixodes ricinus* jako sheep tick. Prawidłowa nazwa angielska – to znaczy używana przez autorów Anglików - to common tick. Osobiście w ogóle odradzam podawanie nazw angielskich zwierząt i proponuję pozostać jedynie przy łacińskich. Wielu autorów nieangielskojęzycznych popełnia błąd polegający na bezpośrednim tłumaczeniu na angielski nazw zwierząt ze swojego języka, bez sprawdzenia jak naprawdę Anglicy go nazywają. Stąd spotyka się w publikacjach tę samą nazwę angielską

stosowaną dla różnych gatunków kleszczy, i odwrotnie, jeden gatunek kleszcza nosi kilka nazw, których źródłem są takie właśnie nierozważne tłumaczenia.

Wszystkie wspomniane zarzuty są typowe dla rozpraw dyplomowych, i nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

W podsumowaniu oceny stwierdzam, że przedstawiona mi rozprawa wnosi do parazytologii i zoologii cenne informacje o wzajemnych relacjach pomiędzy żywicielem a pasożytem. Są to pierwsze planowe i opisane obserwacje wzajemnych wpływów pcheł, kleszczy i gryzoni w Polsce i powinny być jak najszybciej opublikowane w liczących się czasopismach. Jak wspomniałem powyżej, dają wiele możliwości kontynuacji i rozwijania pojawiających się w ich trakcie wątków badawczych. Jednym z takich może być znalezienie korelacji pomiędzy infestacją ektopasożytami a wiekiem myszy. Duże pole do popisu mogą dać pasożyty wewnętrzne.

Wniosek końcowy

Moja ocena rozprawy doktorskiej p. mgr Mileny Zduniak pt. „Zduniak pt. „Różnice międzyosobnicze, a pasożyty: wpływ zachowania, użytkowania przestrzeni i cech fizycznych żywiciela na liczebność ektopasożytów myszy leśnej (*Apodemus flavicollis*)” jest jednoznacznie pozytywna. Wartość naukowa przeprowadzonych badań i ich opracowanie w formie dysertacji, spełniają warunki stawiane przed rozprawami doktorskimi, i wobec tego wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Mileny Zduniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 30.11.2023 r.

Grzegorz Karbownik