



Warszawa, dn. 02.06.2022

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Artura Trzebnego
pt. „Różnorodność gatunkowa Microsporidia
u wybranych stawonogów hematofagicznych
i wpływ obecności mikrosporydiów na mikrobiom gospodarza”

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Głównym celem badań Pana Artura Trzebnego było określenie różnorodności mikrosporydiów wstępujących u komarów i kleszczy a także określenie wpływu obecności mikrosporydiów na skład i funkcję mikrobioty komarów. Doktorant opracował własną metodę do jednoczesnego oznaczenia gatunków mikrosporydiów i komarów (żywicieli), co stanowi jedno z najbardziej znaczących osiągnięć rozprawy. Metoda ta pozwoliła także na wykrycie i analizę współwystępowania różnych gatunków mikrosporydiów u poszczególnych osobników żywicieli oraz identyfikację nowych genotypów/ gatunków.

Tematyka rozprawy jest bardzo ciekawa i dobrze wpisuje się w najnowsze trendy badań, zarówno nad mikrosporydiami, jak i wektorami. Mikrosporydia są dobrze znane jako organizmy izolowane z prób środowiskowych, patogenne dla ludzi i zwierząt. Są także bez wątplenia szeroko rozprzestrzenione u stawonogów, jednak ich występowanie u i wpływ na stawonogi hematofagiczne są mniej rozpoznane i stanowią obiekty zainteresowań badawczych wielu grup. Badania przeprowadzone w prezentowanej rozprawie w znacznym stopniu poszerzają wiedzę w tym temacie i otwierają nowe możliwości badań poprzez opracowanie metody metabarkodingu. W czasie ostatnich 10 lat wzrosła znacząco liczba badań nad mikrobiotą stawonogów hematofagicznych. Takie zagadnienia jak wpływ mikrobioty na rozwój osobniczy, rozród wektorów czy interakcje z przenoszonymi patogenami doczekały się wielu znaczących publikacji. Także obecna rozprawa przyczynia się w istotnym stopniu do rozpoznania trójstronnych zależności w układzie wektor (komar)-mikrobiota- mikrosporydia. Co ciekawe, z badań przeprowadzonych przez Pana Trzebnego wynika, że kleszcze cechuje znacznie zubożona fauna mikrosporydiów w porównaniu do komarów.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Artura Trzebnego została wykonana pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Mirosławy Dabert, w Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Na rozprawę doktorską mgr Trzebnego składają się 4 pełnowymiarowe, wieloautorskie prace badawcze powstałe w latach 2020-2022: trzy opublikowane i jedna złożona do redakcji. Wszystkie prace opublikowano/złożono do druku w czasopiśmie międzynarodowym o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) i wysokiej pozycji na liście JCR (Q1): *Molecular Ecology Resources*, IF = 7.090 (IF₅ = 7.176), MNiSW = 140 pkt, **7 cytowań** (4 bez autocytowań); *Microbial Ecology*, IF = 4.552 (IF₅ = 4.770), MNiSW = 100 pkt; *Parasites & Vectors*, IF = 3.876 (IF₅ = 3.959), MNiSW = 100 pkt oraz *Scientific Reports* (złożona), IF = 4.476 (IF₅ = 5.134), MNiSW = 140 pkt. Łączny IF trzech opublikowanych prac wynosi 15.518.

We wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem i autorem korespondującym, w trzech także zapewnił finansowanie badań. Do rozprawy załączono wymagane oświadczenia wszystkich współautorów prac wchodzących w jej skład, potwierdzające kluczową rolę (50-75% wkładu) doktoranta w formułowaniu hipotez badawczych, planowaniu i wykonaniu badań, analizie uzyskanych wyników (w tym analizie bioinformatycznej) oraz w przygotowaniu manuskryptów.

Ocena merytoryczna

Główna część rozprawy (trzy publikacje) jest poświęcona badaniom nad mikrosporydiami występującymi u komarów. W mojej opinii najbardziej znacząca jest pierwsza praca, Trzebny i wsp. 2020, w której opracowano i zastosowano metodę metabarkodingu. Metabarkoding to metoda oparta na zastosowaniu uniwersalnych starterów dla badanej grupy organizmów (np. zooplankton, bakterie glebowe, komary czy mikrosporydia) w połączeniu z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem nowej generacji (NGS). Metoda ta pozwala na jednoczesną identyfikację/genotypowanie wielu spokrewnionych gatunków, których wykrycie i oznaczenie za pomocą metod klasycznych i konwencjonalnej metodyki 'PCR i sekwencjonowanie sangerowskie' byłoby niemożliwe lub bardzo trudne. Metabarkoding pozwala więc na stosunkowo łatwe, tanie i szybkie oznaczenie 'ukrytej bioróżnorodności'. Doktorant opracował metodykę metabarkodingu mikrosporydiów (z możliwością rozróżnienia niemal wszystkich gatunków należących do 'klasycznych mikrosporydiów') poprzez amplifikację hiperzmiennego regionu V5 genu małej podjednostki RNA (18S rDNA) oraz metabarkoding komarów poprzez amplifikację fragmentu uznanej sekwencji barkodu: genu podjednostki I oksydazy cytochromu c (z ang. COI). Biblioteki V5 i COI były następnie łączone i poddane sekwencjonowaniu NGS, wraz z odpowiednią obróbką bioinformatyczną otrzymanych odczytów. Metodę zwalidowano w oparciu o znane gatunki mikrosporydiów i komarów, a następnie zastosowano w badaniach komarów odłowionych ze środowiska. Metabarcoding pozwolił na wykrycie 11 gatunków/rodzajów mikrosporydiów i oznaczenie gatunku odłowionych komarów. Wśród wykrytych mikrosporydiów były gatunki typowe dla komarów, ale także gatunki znane jako patogeny, chociaż nie wiadomo na ile komary mogą

być ich wektorami, czy nie były to wykrycia przypadkowe, np. pozostałości z krwi żywicieli komarów. Jednym z bardzo ciekawych wyników tych badań jest wykrycie nowego gatunku/genotypu *Microsporidium* sp. PL01, które wykryto w większości prób. Mgr Trzebny wykazał także współwystępowanie kilku gatunków/rodzajów mikrosporydiów oraz brak specyficzności żywicielskiej – obecność danych gatunków/genotypów u różnych gatunków komarów.

W kolejnej publikacji (Trzebny i wsp. 2022b, złożona do redakcji Sci Rep) opracowaną metodę metabarkodingu zastosowano do przebadania dużej grupy komarów pozyskanych ze środowiska (n=2166). DNA 13 gatunków/rodzajów mikrosporydiów wykryto u 35% komarów (bez znaczących różnic między samicami a samcami), należących do 10 gatunków. Potwierdzono brak specyficzności żywicielskiej mikrosporydiów: dwa najczęstsze gatunki zidentyfikowano u 9/10 gatunków żywicieli, a każdy z oznaczonych gatunków/rodzajów stwierdzono u co najmniej 3 gatunków komarów. Przy tak wysokim odsetku pozytywnych prób, wykrywano również więcej niż jeden gatunek/rodzaj mikrosporydiów u 3.6% komarów. Podobnie jak w poprzedniej pracy, potwierdzono, iż najczęstszym gatunkiem wykrywanym u komarów było *Microsporidium* sp. PL01. Uzskane wyniki wskazują na łatwą transmisję mikrosporydiów między gatunkami komarów.

Ponieważ do recenzji przedstawiono manuskrypt jeszcze nie opublikowany, znajdują się w nim pewne drobne niedociągnięcia, które należy poprawić przed opublikowaniem, np. wykres 2 ma niejasny tytuł i chyba lepiej byłoby przedstawić udział poszczególnych gatunków żywicielskich na wykresie kołowym niż w postaci kolumn – dokładny udział % jest trudny do odczytania w tej formie. Opis korelacji- w tekście pojawia się korelacja Pearsona a w opisie do wykresu 3: korelacja rang Spearmana.

W tabeli 'Supplemenatry Table 7' przydałyby się linie oddzielające poszczególne wiersze, gdyż trudno jest przypisać poszczególne dane.

Trzecia publikacja (Trzebny i wsp. 2021) zawiera bardzo ciekawe i nowe wyniki dotyczące metabarkodingu zespołu bakterii u 5 gatunków komarów i powiązań w występowaniu mikrosporydiów i poszczególnych taksonów bakterii. Doktorant otrzymał istotne powiązania pomiędzy obecnością DNA mikrosporydiów a występowaniem bakterii należących do *Spiroplasmataceae* i *Leuconostocaceae*, reprezentowanymi przez, odpowiednio, nowy genotyp *Spiroplasma* sp. PL03 i *Weissella* cf. *viridescens*. Co ciekawe, *W.* cf. *viridescens* zidentyfikowano tylko u osobników pozytywnych dla mikrosporydiów. Doktorant przeanalizował także zmiany funkcjonalne zespołu mikrobioty i wykazał, że mikrobiota komarów zarażonych mikrosporydiami w porównaniu z mikrobiotą komarów niezarażonych, charakteryzowała się zdolnością biosyntezy antybiotyków z grup ansamycyn i wankomycyny oraz wyższą aktywnością szlaku pentozofosforanowego. Tym samym potwierdzono hipotezę, że mikrosporydia mogą wpływać na szlaki metaboliczne mikrobioty żywiciela.

W ostatniej pracy, Trzebny i wsp. 2022a, określono po raz pierwszy z wykorzystaniem metod molekularnych (metabarkodingu, NGS) występowanie mikrosporydiów u kleszcza pospolitego *Ixodes ricinus*. Wśród 1164 przebadanych kleszczy, DNA mikrosporydiów (nowy genotyp *Endoreticulatus* sp. PL02) wykryto tylko u bardzo niskiego odsetka osobników (<1%), a gatunek zoonotyczny, *Encephalitozoon intestinalis*, zidentyfikowano tylko u 3 kleszczy częściowo najedzonych, zebranych z psów. W ten sposób potwierdzono, że zarażenia mikrosporydiami są rzadkie u kleszczy, i kleszcze zapewne nie są źródłem zarażenia tymi mikroorganizmami dla zwierząt i ludzi.

Jeśli chodzi o uwagi krytyczne, to oprócz drobnych ww uwag do pracy w recenzjach, nie mam takich uwag. Przeciwnie, uważam że wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy zostały przygotowane niezwykle starannie. Na podkreślenie zasługuje bardzo rzetelna i dokładna analiza i prezentacja wyników, które przedstawione są także w obszernych materiałach dodatkowych, których przygotowanie wymagało niewątpliwie dużo pracy i staranności, a które są bardzo użyteczne dla czytelników. Sekwencje uzyskane podczas badań zdeponowano w bazie GenBank i dokładnie opisano wszystkie zdeponowane izolaty.

Moje główne pytanie do doktoranta dotyczy jego opinii na temat nowo wykrytego genotypu 'Microsporidium sp. PL01' – czy jest to nowy gatunek/rodzaj? Czy jednak można by go przypisać to już opisanego gatunku (jakiego)? Jak można by rozwiązać problem przynależności systematycznej tego powszechnie występującego organizmu?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pana Artura Trzebnego jest bardzo znaczącym wkładem w rozwój wiedzy na temat występowania mikrosporydiów u krwio pijnych stawonogów, komarów i kleszczy. Doktorant opracował bardzo użyteczną metodę metabarkodingu mikrosporydiów i komarów, która powinna znacząco ułatwić prowadzenie badań nad tymi układami patogen-żywciel. Spodziewam się, że metodyka ta będzie szeroko stosowana a prace dobrze cytowane. Na podkreślenie zasługuje wysoki poziom merytoryczny opublikowanych prac i pionierskie wyniki, m.in. wykrycie nowych genotypów/gatunków/rodzajów mikrosporydiów w komarach i kleszczach. Opracowana metodyka i przeprowadzone badania świadczą o znakomitym poziomie naukowym Doktoranta.

Podsumowując, stwierdzam że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana Artura Trzebnego spełnia wymagania określone odpowiednimi przepisami, w związku z tym wioskuję do Rady Dyscypliny UAM o dopuszczenie mgr Trzebnego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na bardzo wysoką wartość przeprowadzonych badań, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Anna Bajer
Kierownik Zakładu Eko-epidemiologii Chorób Pasożytniczych
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Wydział Biologii UW, Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa