



**ISEZ PAN**

**Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk**

**ul. Sławkowska 17 • 31-016 Kraków**

Kraków, 9.06.2022r.

Dr hab. Sebastian Tarcz  
Zakład Bioróżnorodności Molekularnej  
Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN  
Ul. Sławkowska 17, 31-016 Kraków

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Artura Trzebego "Różnorodność gatunkowa  
Microsporidia u wybranych stawonogów hematofagicznych i wpływ obecności  
mikrosporydiów na mikrobiom gospodarza"**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Artura Trzebego została wykonana pod kierunkiem prof. UAM Mirosławy Dabert w Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy bioróżnorodności Microsporidia u wybranych gatunków bezkręgowców hematofagicznych. Badane przez Doktoranta organizmy eukariotyczne to obligatoryjne pasożyty, które mogą infekować szerokie spektrum gospodarzy w tym człowieka. Obecność spor Microsporidia notowano na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Antarktydy w ekosystemach słodkowodnych, słonowodnych, morskich i lądowych. Niemniej jednak, pomimo szerokiego rozprzestrzenienia, informacje na temat występowania i bioróżnorodności Microsporidia są nadal niewystarczające.

Pan Artur Trzebny planując swoje badania zwrócił uwagę na brak sprawdzonej metodyki, która byłaby skutecznym narzędziem służącym ocenie różnorodności gatunkowej badanych organizmów. Zatem jednym z celów jego rozprawy doktorskiej było opracowanie skutecznej metody przydatnej do wykrywania Microsporidia w oparciu o uniwersalny marker DNA. Z uwagi na fakt bycia najważniejszymi wektorami patogenów kręgowców, jako model do badań Doktorant wybrał następujące bezkręgowce hematofagiczne będące jednocześnie gospodarzami dla Microsporidia: komary (rodzina Culicidae) oraz kleszcze (rodzina Ixodidae). W pracy doktorskiej mgr Artur Trzebny postawił następujące pytania: (1) jaka jest faktyczna różnorodność gatunkowa Microsporidia u tych gospodarzy?; (2) czy Microsporidia infekujące tego samego gospodarza oddziałują ze sobą?; oraz (3) czy zakażenie Microsporidia wpływa na mikrobiom gospodarza? Według Doktoranta znalezienie odpowiedzi na powyższe pytania stworzy nowe możliwości badań w obszarze ekologii tych pasożytów i może mieć zastosowanie w diagnostyce medycznej.

Telefon: (12) 422 19 01 • Fax: (12) 422 42 94 • E-mail: [office@isez.pan.krakow.pl](mailto:office@isez.pan.krakow.pl)

REGON • 000326227 NIP • 675 000 18 86

[www.isez.pan.krakow.pl](http://www.isez.pan.krakow.pl)



### **Ocena formalnej strony pracy**

Rozprawę doktorską stanowi zbiór czterech, w mojej ocenie spójnych tematycznie artykułów, z których trzy zostały opublikowane w latach 2020-2022 w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Ostatni z artykułów został w kwietniu br. wysłany do Scientific Reports i jest aktualnie w recenzji.

W pierwszym artykule Doktorant opublikował wyniki badań nad opracowaniem czułej i szybkiej metody wykrywania DNA Microsporidia u bezkręgowców hematofagicznych (Trzebny i in., 2020). W drugiej publikacji została przeanalizowana prevalencja i różnorodność Microsporidia na dużej (tj. 2166 osobników) próbie komarów europejskich, w celu weryfikacji hipotez dotyczących gatunków potencjalnie poliksenicznych oraz wzajemnych oddziaływań różnych gatunków Microsporidia występujących w koinfekcjach u jednego gospodarza (Trzebny i in., wysłany do Scientific Reports). Trzecia publikacja dotyczyła analiz zmian mikrobioty jelitowej komarów związanych z obecnością Microsporidia (Trzebny i in., 2021). W ostatnim artykule wchodzącym w skład pracy doktorskiej (Trzebny i in., 2022) Doktorant analizował stopień infekcji pasożytniczej u kleszczy z uwzględnieniem ich roli, jako potencjalnych wektorów zoonotycznych gatunków Microsporidia.

Z punktu widzenia oceny bibliometrycznej pracę doktorską mgr Artura Trzebego, oceniam bardzo wysoko. Trzy artykuły wchodzące w skład rozprawy ukazały się kolejno w następujących czasopismach naukowych: Molecular Ecology Resources w 2020 r. (IF 7.090; MEiN 140), Microbial Ecology w 2021 r. (IF=4.552; MEiN 100) i Parasites & Vectors (IF=3.876; MEiN 100) w 2022 r. Z kolei publikacja autorstwa Trzebny A., Mizera J., Dabert M. oznaczona w autoreferacie numerem 2 została w kwietniu br. złożona w redakcji Scientific Reports i jest aktualnie w recenzji. Łączny Impact Factor opublikowanych do tej pory artykułów wynosi 15.518 a po opublikowaniu ostatniego artykułu w Scientific Reports Impact Factor będzie wynosił 19,973. Należy podkreślić, że we wszystkich publikacjach Doktorant był pierwszym autorem a Jego wkład według złożonych oświadczeń współautorów był zdecydowanie dominujący i wynosił od 50 do 75%. Poza artykułami i oświadczeniami współautorów praca doktorska mgr Artura Trzebego składa się ze streszczenia w wersji polskiej i angielskiej, wykazu publikacji wchodzących w skład cyklu, autoreferatu w wersji polskiej i angielskiej, w którym zacytowano 45 pozycji literatury oraz informacji na temat finansowania badań opisanych w pracy doktorskiej.

Tu należy wspomnieć, że zaangażowanie mgr Artura Trzebego w prowadzone w ramach pracy doktorskiej badania zaowocowało otrzymaniem grantu Preludium NCN jak również finansowania z innych źródeł.

Jeśli chodzi o sam układ pracy doktorskiej to jest on poprawny przy czym mam jedno zastrzeżenie co do kolejności artykułów wchodzących w skład cyklu. Uważam, że ze względu na chronologię czasową jak również status danego artykułu (tj. w przygotowaniu/wysłany do redakcji/przyjęty do druku/opublikowany) publikacja nr 2 powinna znaleźć się na końcu cyklu. Prosiłbym Doktoranta o wyjaśnienie takiego a nie innego układu artykułów. Autoreferat jest napisany jasnym, klarownym językiem dzięki czemu nie tylko wprowadza czytelnika w problematykę pracy doktorskiej ale także uzasadnia znaczący wkład Doktoranta w powstanie artykułów wchodzących w skład cyklu. Strona graficzna rozprawy doktorskiej



również prezentuje wysoki poziom co przekłada się na bardzo dobry odbiór prezentowanych treści.

### Ocena uzyskanych wyników

Mgr Artur Trzebny w swojej pracy doktorskiej podjął się ciekawego tematu jakim są infekcje *Microsporidia* pasożytów kręgowców w tym człowieka.

Powstanie pracy doktorskiej nie byłoby możliwe bez opracowania skutecznej metodyki służącej wykrywaniu *Microsporidia* (Trzebny i in., 2020). Mgr Trzebny słusznie wybrał wysokoprzepustowe sekwencjonowanie DNA jako bazę do opracowania diagnostyki *Microsporidia*. Zastosowanie takiego podejścia pozwoliło na jednoczesną analizę dużej ilości badanych prób, co więcej w jednej próbie można było jednocześnie identyfikować gospodarzy (komary i kleszcze) jak i pasożytujące w nich *Microsporidia* a to z kolei dawało możliwość oceny ich powiązań ekologicznych. Wstępne eksperymenty wskazały, że powszechnie stosowany w metabarkodingu *Microsporidia* marker V1-V3 ssu rDNA jest mało specyficzny ponieważ w czasie sekwencjonowania generuje dużo sekwencji z innych organizmów. W oparciu o dostępne sekwencje *Microsporidia* Doktorant zaprojektował startery do amplifikacji hiper-zmiennego regionu V5 ssu DNA i potwierdził jego skuteczność w diagnostyce badanych jednokomórkowców. Do identyfikacji gatunkowej stawonogów mgr Trzebny również zaprojektował startery, które amplifikowały krótki fragment mitochondrialnego genu COI (tzw. barkod DNA). Uwagę zwraca potencjalna możliwość wykorzystania opracowanej metodyki w diagnostyce *Microsporidia* z innych typów izolatów DNA co przekłada się na jej aspekt praktyczny.

Kolejne publikacje wchodzące w skład cyklu są odpowiedzią na postawione przez Doktoranta pytania. Manuskrypt nr 2 (w recenzji w *Scientific Reports*) weryfikuje hipotezę o monokseniczości badanych *Microsporidia* izolowanych z europejskich komarów. Dodatkową wartością jest wnikliwa analiza zależności infekcji od gatunku gospodarza, jego płci czy temperatury siedliska. Doktorant wskazuje na obecność nowego dla nauki gatunku w oparciu o bioinformatyczną analizę uzyskanych sekwencji DNA (*Microsporidium* sp. PL01). Brakuje mi tutaj pełnego opisu nowo zidentyfikowanego taksonu – czy zostanie on w przyszłości przedstawiony w oddzielnym artykule? Na podstawie jakich cech były identyfikowane inne gatunki np. *Amblyospora* sp. 1 czy *Microsporidium* sp. BLAT1?

Analiza wpływu infekcji *Microsporidia* na skład mikrobiomu gospodarza była niezwykle ambitnym zadaniem. Czy wg. Doktoranta wybór gatunków gospodarza mógł mieć wpływ na otrzymane wyniki? W artykule przedstawiono dowody, że infekcja *Microsporidia* może wpływać na skład i zmianę metabolizmu mikrobiomu gospodarza. Czy wg. Doktoranta obserwowane zmiany takie jak np. promowanie syntezy nukleotydów były korzystne dla *Microsporidia* zasiedlających gospodarza?

Czwarta część rozprawy doktorskiej rozszerza jej problematykę o kolejną grupę tj. kleszcze (rodzina Ixodidae). Doktorant zauważył, że informacje na temat infekcji *Microsporidia* u kleszczy są bardzo nieliczne i zasugerował, że kleszcze w przeciwieństwie do komarów mogły wykształcić mechanizmy obronne, które znacząco obniżają ryzyko infekcji. Co istotne, żaden z badanych osobników nie był wektorem patogennych *Microsporidia*. Do części



autoreferatu opisującego wyniki z czwartego artykułu mam jedną uwagę językową: nie piszemy „w kleszczach” a raczej „u kleszczy”.

Uzyskanie przez Doktoranta wyniki oceniam wysoko - nie tylko ze względu na umiejętne zaplanowanie eksperymentów, opracowanie potrzebnej metodyki, solidny warsztat statystycznego i graficznego opracowania wyników ale także ze względu na aspekt praktyczny poruszanej tematyki jakim jest diagnostyka gatunkowa oraz poznanie bioróżnorodności i zależności ekologicznych u słabo zbadanej grupy jaką są Mikrosporidia. Dowodem na to, że jest to temat warty zainteresowania naukowego są cytowania 9 publikacji z udziałem Doktoranta (opublikowanych w latach 2020-2022): liczba cytowań 66 indeks H=4 (wg. bazy Scopus stan na 9.06.2022).

### **Wnioski końcowe**

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska mgr Artura Trzebnego spełnia wszystkie 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.). Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Artura Trzebnego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, ze względu na ponadprzeciętną jakość naukową recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej zwracam się Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu z prośbą o rozważenie wyróżnienia jej stosowną nagrodą.

Sebastian Tarcz