

prof. dr hab. Maria Dynowska
Katedra Mikrobiologii i Mykologii
UWM w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt. „Zróżnicowanie wrażliwości kleszczy *Ixodes ricinus* (L., 1758)
i *Dermacentor reticulatus* (Fabr., 1794) na środowiskowe entomopatogeny bakteryjne
i grzybowe”

PANI MGR ANNY SZCZEPAŃSKIEJ

Temat pracy bardzo dobrze wpisuje się w aktualną problematykę parazytologiczną dotyczącą znaczenia kleszczy jako rezerwarów oraz wektorów licznych chorób człowieka i zwierząt, a także w badania obejmujące poszukiwanie biologicznych metod zwalczania kleszczy jako alternatywy dla metod chemicznych.

Pracę o klasycznym układzie treści, rozpoczyna „Wstęp” (Rozdz. I) składający się z 2. obszernych podrozdziałów. Pierwszy (I.1) jest przeglądem metod obejmujących szeroko rozumianą kontrolę liczebności i negatywnego, wieloaspektowego działania stawonogów niepożądanych przez człowieka, przynoszących straty ekonomiczne w rolnictwie, hodowli zwierząt oraz zagrażających bezpośrednio lub pośrednio zdrowiu człowieka (najczęściej jako wektory czynników etiologicznych groźnych chorób). Autorka omawia kolejno metody fizyczne, chemiczne i biologiczne podkreślając ich skuteczność w stosunku do stawonogów oraz wpływ na inne organizmy i środowisko. Przy metodach chemicznych dużo miejsca poświęca DDT i innym pestycydom, związkom bardzo skutecznym przy zwalczaniu komarów, szarańczy czy kleszczy w krajach tropikalnych i subtropikalnych ale niezwykle toksycznym dla ludzi i owadożernych zwierząt. Zwraca uwagę także na produkty powstałe w wyniku rozkładu pestycydów prowadzące do skażenia gleby i wód oraz nasilające się zjawisko nabywania oporności stawonogów na konkretne pestycydy. Należy podkreślić, że zjawisko nabywania oporności przez mikro- i makroorganizmy na chemiczne środki zwalczania ich występuje na całym świecie i stanowi wyzwanie do poszukiwania innych metod zwalczania organizmów szkodliwych. Są nimi metody biologiczne wykorzystujące pospolite i naturalnie występujące w przyrodzie zjawiska antagonizmu. Podobnie jak w przypadku metod chemicznych Doktorantka ujmuje zagadnienie historycznie, zwięźle i bardzo wyczerpująco dając konkretne przykłady stosowania metod biologicznych

w zwalczaniu niepożądanych bezkręgowców i kręgowców oraz omawia różne typy biokontroli i ich skutki (także negatywne, np. przy introdukcji gatunków obcych). W nawiązaniu do tematu nieco szerzej analizuje udział bakterii oraz entomopatogenicznych grzybów wykorzystywanych w biokontroli. Podkreśla znaczenie bakterii z rodzaju *Bacillus* (głównie *B. thuringiensis* i gatunków filogenetycznie bliskich) opisując zakres i specyficzność ich stosowania oraz wyjaśniając biochemiczno-fizjologiczne mechanizmy bójkowego działania endo- i egzotoksyn oraz swoistych białek (VIP, P20, SIP) i enzymów produkowanych przez wymienione bakterie w stosunku do owadów, pajęczaków, skąposzczetów, nicieni a nawet grzybów. Podaje przykłady biopreparatów z wykorzystaniem bakterii. Wśród entomopatogenicznych grzybów, których stosowanie w zwalczaniu szkodników ma dłuższą historię niż bakterie Doktorantka wymienia te najpospolitsze (*Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Entomophthora*, *Neozygites*, *Nomuraea*) i te najczęściej wykorzystywane w biologicznej kontroli stawonogów: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* oraz *Isaria fumosorosea*. Następnie, opisuje krótko ich cykl życiowy i czynniki wirulencji. Uwypukla znaczenie aktywności enzymatycznej bakterii i grzybów jako wykładników siły degradującej składniki tkanek stawonogów, zwracając szczególną uwagę na enzymy chitynolityczne, lipolityczne i proteolityczne. Kończąc podrozdział, Doktorantka cytuje piśmiennictwo dotyczące właściwości repelencyjnych grzybów wobec niektórych stawonogów zauważając, że niektóre z nich dysponują mechanizmami, które mogą wykrywać i unikać zarodniki grzybów.

Drugi podrozdział (I.2) to obszerna charakterystyka ekofizjologiczna kleszczy z uwypukleniem skutków ich pasożytnictwa oraz wskazanie gatunków endemicznych i kosmopolitycznych o największym znaczeniu medyczo-weterynaryjnym jako rezerwuarów groźnych neurotoksyn oraz rezerwuarów i wektorów czynników etiologicznych chorób wirusowych (wirusowe zapalenie mózgu, gorączka krwotoczna ...), bakteryjnych (borelioza, gorączka Q...) czy wywoływanych przez piroplazmy (babeszioza). Doktorantka podkreśla, że kleszcze mogą przenosić jednocześnie kilka patogenów, a symptomy chorób przenoszonych przez nie mogą wystąpić po wielu latach. Największy nacisk został położony na *Borrelia burgdorferi* s.l. – krętek przenoszony w USA przez *Ixodes scapularis*, w Azji przez *I. persulcatus*, a w Europie przez *I. ricinus*. Ten ostatni oraz *Dermacentor reticulatus* – obiekty badań Doktorantki – zostały omówione najdokładniej (siedlisko, zasięg występowania, uwarunkowania klimatyczne, aspekty troficzne/żywiciele) także w kontekście przenoszenia różnych gatunków *Borrelia* oraz innych w.w. czynników chorobotwórczych. W przypadku *D. reticulatus* podkreślono jego udział w przenoszeniu *Babesia canis*

i *Rickettsia* spp. oraz licznych wirusów (np. Flaviviridae). Dalsza część podrozdziału I.2. analizuje metody ochrony przed kleszczami i chorobami odkleszczowymi z wybiórczym zastosowaniem szczepionek, a także repelentów pochodzenia naturalnego i syntetycznego oraz możliwościami łączenia tych związków celem zwiększenia skuteczności bójczej. Doktorantka podkreśla, że stosowanie chemicznych środków zwalczania kleszczy niesie ze sobą bezpośrednie lub pośrednie zagrożenie dla zwierząt (skażenie roślin, gleby, wód a nawet powietrza). Zwraca uwagę na stosowanie chemicznych akarycydów z feromonami, co sprzyja skupianiu się osobników w grupy, a to umożliwia kontrolę i zwalczanie. Cytuje piśmiennictwo wskazujące na nabywanie przez kleszcze oporności na różnego typu preparaty. Powyższe uwagi stanowią ważne argumenty w podejmowaniu badań dotyczących biologicznych metod zwalczania szkodników. Wstęp kończą informacje ujmujące historycznie problem biokontroli i ograniczenia populacji kleszczy. Dotyczą one owadów pasożytujących na kleszczach, wybranych zwierząt żywiących się kleszczami, nicieni oraz bakterii i grzybów. Największą uwagę badaczy zwróciły bakterie z rodzaju *Bacillus*, szczególnie różne szczepy *B. thuringiensis* oraz entomopatogeniczne grzyby: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Verticillium* spp.. Wykazano ich wysoką aktywność bójczą w stosunku do kleszczy różnych kontynentów z wyjątkiem europejskich *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*, którym poświęcona jest recenzowana praca. W przypadku *D. reticulatus*, jak dotąd, nieznaną jest wirulencja grzybów. To jeszcze mocniejszy argument wyboru problematyki badań i tematu pracy w pełni oddającego jej treść.

Już przez pryzmat umiejętnie zredagowanego wstępu, będącego przeglądem specjalistycznego piśmiennictwa, widać bardzo dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki i naukowe podejście do uzasadnienia podjętych badań. Przejawia się to nie tylko w doborze informacji ściśle związanych z tematem ale, przede wszystkim, z właściwą ich kolejnością uzasadniającą automatycznie wybór tematu i prowadzącą wprost do sformułowania celu pracy (Rozdz. II).

Celem pracy była analiza biologicznej aktywności wybranych szczepów bakteryjnych i grzybowych o potencjalnym znaczeniu entomopatogenicznym względem europejskich gatunków kleszczy: *I. ricinus* i *D. reticulatus*. Do realizacji celu przyjęto 7 zadań badawczych nazwanych przez Doktorantkę „celami szczegółowymi”, obejmujących: izolację wybranych mikroorganizmów z gleby oraz kleszczy pozyskiwanych z roślinności, morfologiczną i molekularną identyfikację izolatów grzybowych, ocenę wrażliwości *I. ricinus* i *D. reticulatus* na testowane bakterie i grzyby oraz porównanie jej z wrażliwością na komercyjne preparaty oparte na *B. thuringiensis*, *Beauveria* i *Metarhizium*. Podkreślam, że

każda praca powinna mieć jeden cel do osiągnięcia którego dążymy formułując zadania badawcze, a nie cele szczegółowe.

Rozdział III. „Materiał i Metody”, obejmujący 7 głównych podrozdziałów rozpoczyna się informacją o miejscu wykonywania poszczególnych zadań badawczych oraz omówieniem odczynników i podłoży mikrobiologicznych. Izolację, identyfikację, aktywność enzymatyczną oraz wrażliwość kleszczy na entomopatogeny zbadano w zakładzie Ekologii Drobnoustrojów i Ochrony Środowiska Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego, ocenę zdolności repelencyjnych entomopatogenów w Instytucie Agroekologii, Entomologii i Patologii Roślin na Uniwersytecie Aarhus w Danii (wyjazd w ramach programu ERASMUS+), a pozostałe zadania na Wydziale Biologii UW.

Materiał badawczy stanowiły kleszcze *I. ricinus* i *D. reticulatus* pozyskane z łąk i terenów leśnych aglomeracji wrocławskiej oraz z Danii (badania zdolności repelencyjnych) zgodnie z zaleceniami przyjętymi w parazytologii oraz entomopatogeniczne bakterie i grzyby wyizolowane z gleby 38. stanowisk zlokalizowanych w różnych zbiorowiskach roślinnych leśnego kompleksu rekreacyjnego okolic Wrocławia i z 30. kleszczy. Przy opisie postępowania laboratoryjnego z próbkami gleby (str.32) wskazane byłoby zaznaczyć, w jakiej temperaturze próby były przechowywane? Również na str.32 napisano, cyt. „wszystkie próby gleby oraz kleszcze wykorzystane do izolacji mikroorganizmów o potencjalnym znaczeniu entomopatogenicznym analizowano indywidualnie” – to stwierdzenie wydaje mi się oczywiste, gdyby było inaczej badania byłyby niepełne a wyniki niemiarodajne. Dalsze opisy analiz laboratoryjnych dotyczące toku postępowania przy izolacji bakterii oraz grzybów z gleby i kleszczy, a także identyfikacji molekularnej grzybów są przejrzyste i wskazują na duże doświadczenie laboratoryjne Doktorantki oraz precyzyjnie opanowany warsztat pracy. Podobnie można powiedzieć o opisie dalszych metod dotyczących biotestów, przeprowadzonych na kleszczach z zastosowaniem własnych szczepów środowiskowych i pochodzących z kolekcji Instytutu oraz szczepów komercyjnych (preparat VectoBac oparty na *Bacillus thuringiensis israelensis*, MET52 zawierający szczepy *Metarhizium anisopliae*, a Botanigard szczepy *Beauveria bassiana*), aktywności enzymatycznej zbadanych bakterii i grzybów oraz zdolności repelencyjnych grzybów. Dokładnością oraz praktyczną wiedzą wykazała się Doktorantka przy przygotowaniu zawiesiny spor bakteryjnych i grzybowych oraz charakterystyce szczepów *B. thuringiensis*, w której uwzględniła typ biochemiczny, pochodzenie, profil białkowy kryształów bakteryjnych, obecność genów „*cry*” a także przy charakterystyce grzybów z rodzaju *Metarhizium* (2 gatunki: *M. anisopliae* i *M. robertsii*), *Beauveria bassiana* i *Isaria fumosorosea*. Szczegółnej dokładności, z zachowaniem jałowości

i pracochłonności wymagały same biotesty. Do zbadania aktywności enzymatycznej bakterii i grzybów Doktorantka wykorzystwała testy API ZYM (Biomerieux) oraz Chitinase Assay Kit (Sigma) stosując zalecenia producentów. Przy badaniu i analizie zdolności referencyjnych wybranych grzybów wobec *I. ricinus* Doktorantka oparła się na wskazówkach oraz wzorze Wanzala i wsp. (2004). Uzyskane wyniki poddała analizom statystycznym (probitowa Fenney'a, test korelacji r-Pearsona, test Chi-kwadrat), wykonanym za pomocą programu PQstat oraz narzędzi analizy probitowej.

Wyniki (Rozdz. IV) przedstawione zostały rzeczowo, zgodnie z wcześniejszymi założeniami i przyjętym harmonogramem metod. Udokumentowanie ich 109. rycinami (od 6 do 24 w tekście i od 25 do 114 w zał. 3 i 4), w tym bardzo dobrej jakości zdjęciami oraz 7. tabelami i zał. 1 i 2 sprawia, że są bardzo czytelne i odnoszą się do każdego zadania badawczego.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki przynoszą szereg nowych, oryginalnych i ważnych informacji z zakresu ekologii zbadanych gatunków kleszczy oraz ekofizjologii bakterii i grzybów wykazujących potencjalne właściwości bójcze w stosunku do *I. ricinus* i *D. reticulatus*. Zasadniczą część omawianego rozdziału stanowią wyniki biotestów, z wykorzystaniem szczepów bakteryjnych z kolekcji IGM Uniwersytetu Wrocławskiego (4 *B. thuringiensis*, 1 *B. subtilis* i preparatu VectoBac oraz 7. losowo wybranych własnych szczepów grzybów (4. *M. anisopliae* i po 1. *M. robertsii*, *B. bassiana*, *I. fumosorosea*) a także 1. szczepu *B. bassiana* z kolekcji muzealnej i 3. pochodzących z dwóch biopreparatów (2. z MET 52, 1. z Botanigard).

Za najważniejsze wyniki tej części uważam:

1. wskazanie szczepów bakteryjnych nie efektywnych wobec zbadanych kleszczy (*B. thuringiensis* OpQ, PO12, VectoBac) oraz szczepów o najsilniejszym działaniu bójczym (*B. thuringiensis* Qp11: od 30 do 80% śmiertelności wobec samców *D. reticulatus* i samic *I. ricinus* oraz *B. thuringiensis* KpC1: do 80% śmiertelności samców obydwu gatunków kleszczy);
2. stwierdzenie większej wrażliwości kleszczy na szczepy grzybów niż bakterii, a szczególnie *M. anisopliae* LO4, LO10 oraz obydwu testowanych preparatów komercyjnych (w przypadku *M. anisopliae* LO4 śmiertelność samic kleszczy wyniosła 100% przy bardzo niskiej dawce $LC_{50} 2,6 \times 10^3$ cfu/ml, a w przypadku szczepu LO10 wobec samców *I. ricinus*);

3. odnotowanie większej wrażliwości *I. ricinus* na testowane grzyby w porównaniu z *D. reticulatus* oraz większej wrażliwości samic tego drugiego w porównaniu z samicami;
4. określenie czasu aktywności biologicznej najbardziej skutecznych bójczo szczepów bakterii i grzybów z podaniem wartości LC_{50} i LT_{50} ;
5. wskazanie najskuteczniejszego biopreparatu (Botanigard: LC_{50} na poziomie 10^3 - 10^6 cfu/ml, LT_{50} 2,7-8,8 dni).

Wyniki dotyczące aktywności enzymatycznej bakterii i grzybów, uwarunkowanej w dużym stopniu źródłem pochodzenia szczepów, potwierdziły, że aparat enzymatyczny grzybów dysponuje bogatszym od bakterii zestawem enzymów hydrolitycznych, które są wykładnikiem także większej plastyczności troficznej grzybów i wyznacznikiem większego potencjału patogeniczności grzybów w stosunku do bakterii. Na podstawie aktualnej wiedzy o biochemii i fizjologii grzybów można było spodziewać się takiego rezultatu, co w żadnym stopniu nie umniejsza wartości danych, które uzyskała Doktorantka. Według mnie, szczególnie interesujące są wyniki dotyczące produkcji egzo- i endochitynaz oraz zróżnicowania ich aktywności w obrębie tego samego gatunku, a także korelacji pomiędzy poziomem wytwarzania poszczególnych enzymów a wartościami LC_{50} . Doktorantka bardzo ostrożnie podeszła do zinterpretowania tej korelacji a jest ona niezwykle istotna.

Dyskusja (Rozdz. V) bazująca na uzyskanych wynikach własnych, konfrontowanych z tematyczną literaturą, rozszerza informacje dotyczące występowania badanych kleszczy oraz mikrobioty związanej z nimi, zwłaszcza grzybów z różnych grup taksonomicznych i troficznych. Wskazując nieliczne badania obejmujące wpływ entomopatogenicznych mikroorganizmów na różne gatunki kleszczy Doktorantka udowadnia jak niewiele dotyczy *I. ricinus*, a w przypadku *D. reticulatus* wskazuje na ich brak. Analizuje i znacznie rozszerza informacje uzyskane na każdym etapie badań własnych, a komentarze tych analiz są merytoryczne i wynikają z właściwej interpretacji danych. Zwraca uwagę na bardzo istotny aspekt przy zwalczaniu kleszczy: zróżnicowaną wirulencję entomopatogenicznych mikroorganizmów nie tylko w odniesieniu do gatunku, ale także w odniesieniu do stadium rozwojowego i stopnia najedzenia. Dyskusję, napisaną profesjonalnie od strony naukowej i formalnej, zamykają treści, od których Doktorantka rozpoczęła wstęp- moim zdaniem to najwłaściwsze ujęcie.

Treść pracy zamykają: Podsumowanie i Wnioski (Rozdz. VI) oraz Streszczenie, w języku polskim i angielskim (Rozdz. VII i VIII). Zawsze proponuję pozostawić tylko wnioski, gdyż podsumowanie jest powtórzeniem wyników.

W pracy wykorzystano 261 pozycji specjalistycznego piśmiennictwa (Rozdz. IX), w zdecydowanej większości anglojęzycznego, aktualnego, zacytowanego i wykorzystanego bez zastrzeżeń.

Rozdz. X stanowią 4 załączniki zawierające wyniki szczegółowe. Rozdz. XI zawiera spis rycin, XII spis tabel. Całość manuskryptu liczy 168 stron (załącznik nr 1 zawiera tylko wykaz szczepów bakteryjnych, a jego tytuł sugeruje także wykaz grzybów).

Praca napisana jest bardzo dobrym językiem polskim. Styl jest lekki, a treści logicznie powiązane z zachowaniem chronologii zagadnień, co bardzo ułatwia analizę tekstu. Po jej dokonaniu nasunęło mi się kilka pytań o dyskusyjnym charakterze:

1. Na jakiej podstawie uważa Pani, że enzymy hydrolityczne produkowane przez mikrogrzyby i bakterie mają drugorzędne znaczenie w uzyskaniu efektu bójczego? W przypadku zdecydowanej większości patogenów aktywność enzymatyczna decyduje o stopniu patogeniczności/wirulencji.
2. W punkcie 1. (str. 82) zaznaczono, że zbadane kleszcze są „potencjalnie wrażliwe na działanie entomopatogenicznych mikroorganizmów”. Rozumiem, że na tę wrażliwość składa się szereg uwarunkowań- czy zechciałaby Pani uwypuklić te najważniejsze, zwłaszcza w kontekście punktu 5. (str. 82)?
3. Jaki wniosek wynika ze stwierdzenia zamieszczonego w punkcie 3 (str. 82)?
4. W odniesieniu do szeregu aspektów uzyskanych wyników zaznaczono, że są wymagane dalsze badania- które mogą mieć znaczenie priorytetowe?

Postawione pytania nie wynikają z jakichkolwiek niedociągnięć pracy lecz wyłącznie z zaciekawienia badaniami i poruszonymi problemami. Pod każdym względem pracę oceniam wysoko. Jej wyniki uważam za interesujące i bardzo ważne pod względem merytorycznym i aplikacyjnym, a szczególnie te, które dotyczą, dokonanej po raz pierwszy, oceny patogeniczności grzybów wobec *D. reticulatus*.

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13.1. Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Szczepańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą ze względu na szeroko rozumianą wartość naukową oraz oryginalność i unikalność uzyskanych wyników, które wskazują kierunki dalszych badań.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mitynowski', with a horizontal line extending to the right.

Olsztyn, 4. czerwca 2019 roku