



**UNIWERSYTET
PEDAGOGICZNY**
IM. KOMISJI EDUKACJI
NARODOWEJ W KRAKOWIE

Dr hab. Magdalena Nowak-Chmura, prof. UP
Katedra Zoologii, Instytut Biologii i Nauk o Ziemi
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie
magdalena.nowak-chmura@up.krakow.pl

Kraków, 15.09. 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Dagmary Dyczko

**pt. „Wpływ grzybów entomopatogennych na kleszcze jako wektory patogenów
w wybranych typach siedliskowych lasu na terenie Dolnego Śląska”**

Niniejszą recenzję przygotowano na podstawie Uchwały Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 18 marca 2021 roku, w związku z przewodem doktorskim wszczętym przez mgr Dagmarę Dyczko na Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego w dniu 21 marca 2019 roku (uchwała nr 80/2019).

Doktorantka przygotowała swoją rozprawę doktorską pt. „Wpływ grzybów entomopatogennych na kleszcze jako wektory patogenów w wybranych typach siedliskowych lasu na terenie Dolnego Śląska” na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, w Zakładzie Ekologii Drobnoustrojów i Akaroentomologii pod kierunkiem Promotorki Pani dr hab. Doroty Kiewry, prof. UWr oraz Promotorki pomocniczej Pani dr Kingi Plewy-Tutaj, zatem w znanym i cenionym ośrodku naukowym pod opieką merytoryczną Promotorek dysponujących doświadczeniem i wybitnym dorobkiem naukowym w zakresie parazytologii, mikrobiologii, jak również samej dysertacji.

Wyjaśnienie interakcji wektor-żywiciel-patogen jest niezbędne, aby móc w pełni scharakteryzować i opisać mechanizmy przenoszenia patogenów chorób odkleszczowych oraz zweryfikować stanowiska występowania w Polsce zarówno wektorów, rezerwuarów i patogenów. Kluczowe jest określenie wpływu czynników środowiskowych na występowanie,

Uniwersytet Pedagogiczny
im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie ul.
Podchorążych 2, 30-084 Kraków
tel. 12 662 60 14
info@up.krakow.pl www.up.krakow.pl

liczebność kleszczy oraz poziom ich zainfekowania. To wszystko stanowi kompleks badań, bez którego nie da się w pełni zbadać układu pasożyt-żywiciel, i który ma ogromne znaczenie w zastosowaniu metod kontroli populacji kleszczy. Aby móc w pełni przeciwdziałać chorobom odkleszczowym na różnych obszarach w Polsce, a przy tym nie szkodzić środowisku przyrodniczemu i człowiekowi należy prawidłowo ocenić uwarunkowania środowiskowe występowania kleszczy oraz zweryfikować możliwą do zastosowania na danym terenie biokontrolę rodzimych gatunków kleszczy. Udowodniła to Doktorantka podejmując się kompleksowych badań mających na celu ocenę środowiskowych uwarunkowań występowania kleszczy na wybranych terenach i badań, które mogą nas przybliżyć do pełnej znajomości metod biologicznego zwalczania kleszczy z wykorzystaniem grzybów entomopatogennych. W pełni popieram wybór tematu rozprawy doktorskiej mgr Dagmary Dyczko, który znakomicie wpisuje się we współczesne trendy badań naukowych z dziedziny parazytologii i akarologii.

Rozprawa doktorska mgr D. Dyczko jest klasyczną pracą doktorską przygotowaną w formie oprawionego manuskryptu, w skład którego wchodzi: 168 stron, 325 pozycji bibliografii, 26 tabel, 40 rycin i 17 stron załączników. Wyróżnia się starannym opracowaniem graficznym, oraz przejrzystym i logicznym układem jak w standardowych pracach biologicznych, spełniającym we wszystkich szczegółach wymagania stawiane pracom doktorskim. Treść odpowiada tematowi określoneemu w tytule.

Pierwszy rozdział rozprawy to **Wstęp** (24 strony), w którym Doktorantka zaplanowała przegląd najważniejszych informacji o kleszczach (Acari: Ixodida) w tym pozycję systematyczną omawianych gatunków, wektorową rolę kleszczy, wyjaśniła kompetencje wektorowe kleszczy oraz transmisję patogenów. Interesująco i zgodnie z najnowszymi trendami w piśmiennictwie Doktorantka omówiła wpływ patogenów przenoszonych przez kleszcze i innych drobnoustrojów obecnych w ich mikrobiomie na procesy metaboliczne zachodzące w organizmach kleszczy. Obszerny fragment wstępu to przegląd informacji o wpływie czynników środowiskowych na liczebność kleszczy oraz metody kontroli populacji kleszczy (chemiczne i biologiczne), w nim jest zawarta również myśl przewodnia podjęcia badań. Doktorantka zacytowała informacje z dobrze wyselekcjonowanych, oryginalnych publikacji. Tekst tego wprowadzającego rozdziału świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia prac badawczych, których szczegółowe cele zawarła w kolejnym rozdziale **Cel pracy** (1 strona).

Szczegółowy opis technik i metod związanych z pozyskiwaniem materiału, konserwacją, diagnostyką, oraz opracowaniem biologicznym, molekularnym i statystycznym Doktorantka przedstawiła w rozdziale **Materiał i metody** (20 stron). Rozdział jest wzbogacony tabelami, rycinami, mapami i fotografiami.

W technicznej realizacji badań terenowych i laboratoryjnych Doktorantka wykazała się między innymi:

- znajomością map pokrycia terenu dla województwa dolnośląskiego,
- znajomością metod geograficznych systemów informacyjnych GIS,
- dobrze wybranym obszarem badań terenowych i poprawnie stosowaną metodą flagowania - metodą zbioru kleszczy z roślinności,
- prawidłowo zebranymi próbkami gleby w celu izolacji grzybów entomopatogennych (w sumie 72 próbki z dwóch sezonów badań),
- prawidłowo zaplanowaną i przeprowadzoną identyfikacją gatunkową kleszczy i grzybów entomopatogennych (do rodzaju) za pomocą mikroskopu stereoskopowego i zgodnie z odpowiednimi kluczami do oznaczania,
- prawidłowo zaplanowanymi i przeprowadzonymi badaniami laboratoryjnymi, w tym molekularnymi kleszczy *Ixodes ricinus* (nimfy i okazy dorosłe, w sumie 494 okazy) oraz grzybów, były to między innymi: detekcja *Borrelia* spp., identyfikacja genogatunków *B. burgdorferi* s.l., detekcja *Rickettsia* spp., izolacja grzybów entomopatogennych, identyfikacja grzybów entomopatogennych, przygotowanie zawiesiny spor, przeprowadzenie testów biologicznych w kierunku oceny bójczości wyizolowanych grzybów entomopatogennych przeciwko kleszczom *I. ricinus* (sprawdzono 1800 okazów kleszczy: 600 samic, 600 samców, 600 nimf),
- znajomością metod analizy statystycznej i prawidłowego zastosowania ich do interpretacji wyników badań.

W czwartym rozdziale **Wyniki** (38 stron) Doktorantka zamieściła zasadniczą część pracy dzieląc tematycznie otrzymane wyniki badań na pięć podrozdziałów. Uzupełnieniem wyników są tabele i ryciny zamieszczone konsekwentnie w tekście pracy.

W pierwszym podrozdziale Doktorantka skupiła się na wynikach badań świadczących o środowiskowych uwarunkowaniach występowania kleszczy na terenie Nadleśnictwa Miękinia na Dolnym Śląsku, wykazując między innymi:

- różnorodność gatunkową kleszczy zebranych z obszaru badań, potwierdzając

występowanie gatunków: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*,

- strukturę populacji kleszczy, gdzie potwierdziła dominację nimf *I. ricinus*, dominację samic *D. reticulatus* i dominację larw *H. concinna*,

- występowanie kleszczy w każdym typie siedliskowym lasu (9 stanowisk) i w każdym roku zbioru oraz potwierdzając powszechność kleszcza pospolitego *I. ricinus* na obszarach Dolnego Śląska,

- pozytywny wpływ na występowanie kleszczy, takich stanowisk jak: las mieszany świeży (LMśw) (72,2% zebranych kleszczy), bór mieszany świeży (BMśw) (18,3% zebranych kleszczy) i bór świeży (Bśw) (9,5% zebranych kleszczy).

W drugim podrozdziale Doktorantka zamieściła wyniki badań na temat zakażenia kleszczy krętkami *Borrelia* spp., wykazując między innymi:

- obecność DNA *Borrelia* u 83 okazów *I. ricinus*, spośród zbadanych 494 okazów, w tym samic (31,6%), samców (21,6%) i nimf (13,6%),

- zainfekowanie nimf *I. ricinus* *Borrelia* spp. występujących we wszystkich badanych typach siedliskowych lasu,

- pięć wzorów restrykcyjnych, w tym cztery z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. to jest: *B. afzelii*, *B. garinii*/*B. bavariensis*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* oraz jednego gatunku spoza kompleksu: *B. miyamotoi* – bakterii wywołujących gorączki powrotne; dominowały *B. afzelii* i *B. garinii*

- jedną koinfekcję *B. miyamotoi*/*B. lusitaniae*

W trzecim podrozdziale Doktorantka zamieściła wyniki badań na temat zakażenia kleszczy *Rickettsia* spp., wykazując między innymi:

- obecność *Rickettsia* spp u 209 okazów *I. ricinus*, spośród zbadanych 494 okazów, w tym samic (56,6%), samców (43,3%) i nimf (39,8%),

- potwierdzenie w losowych próbach (35/209) obecności *R. helvetica* (32 okazy) i *R. monacensis* (3 okazy).

W czwartym podrozdziale Doktorantka prezentuje wyniki badań na temat koinfekcji *Borrelia* spp. i *Rickettsia* spp., wykazując między innymi:

- koinfekcję dwoma patogenami tj. *Borrelia* spp. i *Rickettsia* spp. u 34 (6,9%) okazów *I. ricinus*, w tym u osobników dorosłych: 7 (11,7%) samic, 4 (6,7%) samców oraz 23 (6,1%) nimf,

- najczęściej rejestrowane w obydwu sezonach koinfekcje: *Rickettsia* spp./*B. garinii*;

Rickettsia spp./*B. afzelii*; *Rickettsia* spp./*B. lusitaniae*.

Piąty podrozdział Doktorantka poświęciła na wyniki badań określające wrażliwość kleszczy wobec środowiskowych izolatów grzybowych. Izolacja grzybów entomopatogennych z gleby z siedlisk występowania kleszczy wykazała między innymi:

- 53 szczepy grzybów entomopatogennych należących do rodzajów: *Metarhizium*, *Beauveria* i *Isaria*,
- dominację grzybów z rodzaju *Metarhizium* (37 szczepów, 69,8%) wyizolowanych z każdego typu siedliskowego lasu, na 7 stanowiskach badawczych,
- najwięcej izolatów grzybów entomopatogennych i ich największą różnorodność z terenów lasów mieszanych świeżych (LMśw) (66,0% wszystkich izolatów),
- identyfikację gatunkową badaniami molekularnymi i przynależność gatunkową 8 izolatów i przypisanie 5 wyizolowanych szczepów do rodzaju, były to: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* oraz rodzaje *Metarhizium* sp. i *Beauveria* sp.

W tym samym podrozdziale Doktorantka przedstawiła wyniki wykonanych biotestów z wykorzystaniem własnych szczepów grzybów entomopatogennych, do których wykorzystano 6 izolatów środowiskowych, w tym cztery szczepy *Metarhizium* i dwa *Beauveria*. Dzięki biotestom Doktorantka wykazała między innymi:

- zróżnicowaną bójczość względem różnych stadiów rozwojowych kleszczy *I. ricinus*,
- skuteczność izolatów grzybowych zarówno przeciwko osobnikom dorosłym i nimfom, jednak zauważalnie mniej podatne okazały się nimfy,
- śmiertelność kleszczy wraz ze wzrostem stężenia zarodników,
- największą skuteczność szczepu 3.4(2) *Metarhizium anisopliae* izolowanego z gleby lasu mieszanego świeżego - wobec testowanych stadiów rozwojowych kleszczy *I. ricinus*, który przy najwyższym stężeniu powodował śmiertelność 93,3% samic, 76,6% samców oraz 73,3% nimf,
- największą wrażliwość na działanie zawiesin konidalnych wykazały samice *I. ricinus*, samce wykazały większą oporność w porównaniu do samic, nimfy były najmniej podatne na działanie grzybów entomopatogennych w porównaniu z osobnikami dorosłymi.

W rozdziale **Dyskusja** (13 i pół strony) Autorka omawia najważniejsze wyniki swojej pracy na tle bogatego piśmiennictwa z Polski i ze świata. Wykazuje przy tym godną uznania dogłębną znajomość przedmiotu i to nie tylko w zakresie biologii i ekologii kleszczy, ale też genetyki, mikrobiologii i strategii zwalczania stawonogów. Pozwala to Doktorantce

na naświetlenie omawianych problemów w sposób wszechstronny i odpowiadający najnowszemu stanowi wiedzy, trendom, a przy tym bardzo interesujący. Moim zdaniem jest to bardzo rzetelnie napisana i ważna część pracy, która daje nowe spojrzenie na wiele aspektów, takich jak: interakcje wektor-żywiciel-patogen oraz wykorzystanie grzybów entomopatogennych w zwalczaniu populacji kleszczy.

Rozdział **Podsumowanie i wnioski** (1,5 strony) to 11 rzeczowo sformułowanych przez Doktorantkę wniosków, każdy z nich jest przemyślany i podsumowuje obszary badań zrealizowane w pracy doktorskiej oraz wskazuje potrzebę poszerzenia i kontynuowania niektórych problemów badawczych.

Ostatnie rozdziały w pracy doktorskiej to **Streszczenie/Abstract** (4 i pół strony), **Bibliografia** (325 pozycji +źródła internetowe), **Załączniki** (17 stron), **Spis rycin** (3 strony), **Spis tabel** (2 strony) i podziękowania.

Rozprawa doktorska autorstwa mgr Dagmary Dyczko stanowi bardzo oryginalny i cenny wkład w naukę i wiedzę na temat kleszczy (Acari: Ixodida), epidemiologii oraz strategii zwalczania kleszczy w środowisku.

Wybrałam kilka aspektów tej pracy zasługujących na podkreślenie:

1. Praca badawcza w terenie.

Ten kilkusezonowy monitoring występowania kleszczy zaowocował niezliczoną ilością wyników, pomiarów i obserwacji. Decydując się na samodzielne, kilkuletnie obserwacje i badania w terenie trzeba oprócz umiejętności praktycznych i topograficznych posiadać również cechy natury osobistej pozwalające na długotrwałe, czasami monotonne czynności, nie zawsze w bezpiecznym miejscu. Doktorantka wybierając taki kierunek badań udowodniła już we wstępie, że zainteresowanie kleszczami to Jej pasja, swoje zadanie badawcze wykonała bardzo starannie udowadniając, że ma umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

2. Różnorodność gatunkowa kleszczy i wykorzystanie map pokrycia terenu zgodnie z obowiązującą w Polsce klasyfikacją siedlisk leśnych do wykazania ryzyka zakażenia chorobami odkleszczowymi w danym typie siedliskowym lasu.

Badania Doktorantki potwierdziły występowanie trzech gatunków kleszczy na Dolnym Śląsku: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* i *Haemaphysalis concinna* i ich udział

w transmisji patogenów na badanym obszarze. Badania nawiązują do najnowszych trendów badań prowadzonych na świecie i udowadniają, że typy siedlisk leśnych mają istotny wpływ na występowanie *I. ricinus*, co sugeruje, że szczegółowe mapy typów siedlisk leśnych w woj. dolnośląskim i całej Polsce mogą być przydatne do oceny zagrożeń chorobami odkleszczowymi. Tylko takie kompleksowe badania, jakie są zaprezentowane w niniejszej rozprawie mogą się przyczynić do pełnej znajomości relacji wektor-żywiciel-patogen. Doceniam zmysł naukowy Doktorantki i pomysł badawczy, który zaowocował praktycznymi informacjami.

3. Biotesty i przydatność szczepów grzybów entomopatogennych w ograniczeniu liczebności kleszczy.

Ciekawość i dociekliwość naukowa doprowadziły Doktorantkę do przeprowadzenia testów i analiz, które zaowocowały obserwacjami gatunków grzybów i ich wykazaną skutecznością w biokontroli, szczególnie, że izolacja grzybów entomopatogennych miała miejsce w tym samym środowisku, w którym występowały kleszcze. Doktorantka przyczyniła się do badań, które mogą mieć ogromne znaczenie w zwalczaniu kleszczy *I. ricinus* metodami nie ingerującymi w środowisko naturalne.

4. Bogata literatura przedmiotu.

Rozprawa doktorska została wzbogacona światową literaturą parazytologiczną oraz z innych dziedzin, trafnie wykorzystaną w rozprawie, w głównej mierze anglojęzyczną. Znacząca większość to pozycje z ostatniego dziesięciolecia. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu i zrealizowaniu badań naukowych.

Wyniki badań prowokują i zachęcają do dyskusji, stąd moje pytania do Doktorantki. Bardzo proszę o odniesienie się do następujących zagadnień podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej:

1. Fauna kleszczy Dolnego Śląska – jak się zmienia na przestrzeni ostatnich lat? Jakie Pani widzi nowe perspektywy występowania kleszczy na tym obszarze?
2. Z Pani badań wynika, że typ siedliska leśnego określonego według systemu klasyfikacji w Polsce ma istotny wpływ na występowanie kleszczy *Ixodes ricinus*, potwierdzają to też badania przeprowadzone w innych krajach. Sugeruje to, że szczegółowe mapy typów siedlisk leśnych mogą być przydatne do oceny zagrożenia chorobami

odkleszczowymi. Pani badania jasno dowiodły o możliwym wpływie typu siedliskowego lasu na poziom zakażenia kleszczy krętkami *Borrelia* spp., dotyczyło to w szczególności lasów mieszanych świeżych. Jak te dane wykorzystać w praktyce? Czy ma Pani jakiś pomysł na wykorzystanie i przydatność takich danych dla turystów czy lokalnych mieszkańców?

3. Czy stosowanie środków do zwalczania kleszczy w Polsce ma sens? Czy Pani zdaniem obszary rekreacyjne powszechnego przebywania ludzi (parki miejskie, place zabaw, szlaki edukacyjne itp.) powinny być objęte kontrolą i strategią zwalczania kleszczy? Jakie jest Pani zdanie na ten temat?
4. Jakie są Pani plany badawcze? Czy będzie kontynuacja badań?

Ponadto drobne uwagi redakcyjne:

- str. 71-73 pomyłki w numeracji rycin
- pod fotografiami należałoby dodać konkretne nazwisko autora zdjęć, jest to nie tylko dobrą praktyką, ale prawem chronionym przez ustawę o prawie autorskim

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Dagmary Dyczko wnosi istotny wkład do rozwoju światowej parazytologii i ma ogromne znaczenie dla zdrowia publicznego i strategii zwalczania kleszczy. Wyniki badań zaprezentowane w rozprawie doktorskiej prezentują bardzo wysoką wartość naukową. Ponadto część wyników badań opublikowana już przez Doktorantkę w czasopiśmie *Parasitology Research* bez wątpienia wzbogaciła światową literaturę i z pewnością zostanie doceniona przez specjalistów.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Dagmary Dyczko pt. „Wpływ grzybów entomopatogennych na kleszcze jako wektory patogenów w wybranych typach siedliskowych lasu na terenie Dolnego Śląska” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie, zarówno pod względem merytorycznym i formalnym wymagania stawiane pracom doktorskim przewidziane w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Dagmary Dyczko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto przedkładaam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek rekomendujący wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą. Zarówno wielowątkowość rozprawy i adekwatne do tego znaczące osiągnięcia, oryginalne w skali Polski i świata dowodzą o przyjętych przez Doktorantkę i zespół Promotorek wysokich standardów badawczych, przez co badania stanowią wyróżniający się oryginalnością wkład do nauki.

Dr hab. Magdalena Nowak-Chmura, prof. UP

Kraków, 15.09.2023