

Ocena

pracy doktorskiej Pani mgr Dagmary Dyczko pt. „Wpływ grzybów entomopatogennych na kleszcze jako wektory patogenów w wybranych typach siedliskowych lasu na terenie Dolnego Śląska” wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Doroty Kiewry, prof. UW i Pani dr Kingi Plewy-Tutaj w Zakładzie Ekologii Drobnoustrojów i Akarontomologii Wydziału Nauk Biologicznych w Uniwersytecie Wrocławskim

Zwiększenie się liczby przypadków chorób odkleszczowych diagnozowanych u ludzi i zwierząt w ostatnim dziesięcioleciu w Europie sprawia, że wciąż utrzymuje się duże zainteresowanie biologią i ekologią ich wektorów - kleszczy i wpływem różnych czynników na stopień zakażenia kleszczy patogenami w różnych siedliskach. W wielu regionach Europy, w tym w Polsce prowadzony jest monitoring występowania kleszczy i związanych z nimi patogenów. Pomimo tego wciąż nie w pełni poznane są uwarunkowania środowiskowe rozprzestrzenienia kleszczy i naturalne mechanizmy regulacji liczebności ich populacji w różnego typu siedliskach.

Wobec dużego zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt wywołanego przez kleszcze i odkleszczowe patogeny niezwykle ważnym i bardzo aktualnym wyzwaniem dla naukowców XXI wieku jest opracowanie skutecznych sposobów ograniczenia liczby tych stawonogów w środowisku poprzez wykorzystanie do zwalczania kleszczy różnych metod biologicznych i chemicznych. Ze względu na możliwość wykształcenia się u kleszczy oporności na substancje chemiczne i potencjalnie szkodliwy wpływ akarycydów na inne organizmy znajdujące się w tym samym ekosystemie coraz większą uwagę

zwraca się na sposoby użycia mikroorganizmów i naturalnych wrogów do ograniczenia liczby kleszczy o dużych kompetencjach wektorowych.

Z przyjemnością zapoznałam się z treścią dysertacji Pani mgr Dagmary Dyczko, która moim zdaniem może inspirować do dalszych badań nad wpływem entomopatogennych grzybów występujących w różnych typach siedliskowych lasu na pospolite w Europie kleszcze *Ixodes ricinus* z potencjalnym ich wykorzystaniem do zwalczania kleszczy.

Praca doktorska została wykonana w ośrodku akademickim o dużych tradycjach badań nad kleszczami i transmisją odkleszczowych patogenów, której główną promotorką jest Pani dr hab. Dorota Kiewra, prof. UWr - autorka wielu prac o dużym znaczeniu dla rozwoju europejskiej akarologii, niezwykle cenionej przez innych badaczy za oryginalność podejmowanych zadań i naukowe osiągnięcia. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że badania wykonane przez Panią mgr Dąmarę Dyczko nad wpływem grzybów na występowanie kleszczy i patogenów w środowisku należą do nielicznych w Europie. W zakresie prezentowanym w niniejszym opracowaniu nie były wcześniej prowadzone w Polsce.

Recenzowana praca wyróżnia się estetyczną formą, bardzo starannym opracowaniem graficznym i przejrzystym układem spełniającym wszystkie wymagania stawiane tego typu pracom. Liczy ona 168 stron oraz zawiera 26 tabel i 21 rycin.

Rozprawa doktorska ma układ typowy dla tego typu opracowań i składa się z 12 rozdziałów, w większości których zostały wyodrębnione podrozdziały. Dzięki temu z łatwością można prześledzić kolejne etapy badań i przeanalizować liczne dane uzyskane w trakcie ich prowadzenia.

W pierwszym doskonale napisanym rozdziale pt. „Wstęp” Autorka przedstawiała najbardziej istotną dla podjętego tematu wiedzę na temat fauny kleszczy Dolnego Śląska oraz rozprzestrzenienia, biologii i roli wektorowej trzech gatunków występujących na badanym obszarze, tj. *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* i *Haemaphysalis concinna*, a także wpływu czynników środowiskowych na liczebność populacji kleszczy. Ponadto w tej części Autorka omówiła metody chemiczne i biologiczne zwalczania kleszczy stosowane w świecie. Przy przygotowywaniu rozdziału „Wstęp” w pełni wykorzystała informacje zawarte w piśmiennictwie dotyczące tej tematyki badawczej.

Cel pracy został jasno sprecyzowany. Nadrzędnym celem była ocena środowiskowych uwarunkowań występowania kleszczy, zwłaszcza *Ixodes ricinus* i związanych z nim patogenów w różnych typach siedliskowych lasów w województwie dolnośląskim oraz określenie ich wrażliwości na glebowe izolaty entomopatogennych grzybów wyizolowanych z miejsc zbiorów kleszczy. Wyznaczony cel pracy został zrealizowany poprzez wykonanie sześciu bardzo dobrze zaplanowanych zadań, a

mianowicie określenie rozprzestrzenienia kleszczy w wybranych typach siedliskowych lasów, analiza wpływu typu siedliskowego lasu i warunków temperatury i wilgotności na liczebność *I. ricinus*, oszacowanie stopnia zakażenia kleszczy *I. ricinus* patogenami - krętkami *Borrelia* spp. i *Rickettsia* spp. występującymi w różnego typu siedliskach, izolacja i identyfikacja szczepów entomopatogennych grzybów pozyskanych z gleby w różnych typach siedliskowych lasów, określenie wrażliwości kleszczy *I. ricinus* na izolaty grzybowe pozyskane z miejsc ich zbioru, a także porównanie wrażliwości nimf i osobników dorosłych tego gatunku kleszcza na wybrane środowiskowe izolaty grzybów.

Rozdział pt. „**Materiał i metody**” zawiera niezbędne informacje o obszarze badań, kryteriach wyboru trzech typów siedliskowych lasów (las mieszany świeży, bór mieszany świeży i bór świeży) oraz 9 stanowisk zbioru kleszczy i prób gleby, a także opis metod badań terenowych i laboratoryjnych. Do wytypowania miejsc badań Autorka wykorzystała wszystkie dostępne źródła, tj. mapy pokrycia terenu lasami dla województwa dolnośląskiego dostępne w Banku Danych o Lasach i metody geograficznych systemów informacyjnych GIS. Charakterystyka stanowisk jest w pełni satysfakcjonująca. Zamieszczone w tym rozdziale mapy, ryciny i tabele są bardzo starannie wykonane przez Autorkę i świetnie uzupełniają opisy. Metodyka zbioru kleszczy i poboru prób gleby w celu izolacji grzybów nie budzi najmniejszych zastrzeżeń. Badania laboratoryjne wykonane przez Panią mgr Dagmarę Dyczko obejmowały identyfikację kleszczy i ich stadiów rozwojowych, izolację DNA z kleszczy, wykrywanie krętków *Borrelia* spp. i genogatunków w kompleksie *B. burgdorferi* sensu lato, wykrywanie *Rickettsia* spp., identyfikację morfologiczną i molekularną entomopatogennych grzybów oraz wykonanie testów biologicznych do oceny bójkowego działania wybranych grzybów. Wybór metod i sposób wykonania badań oraz wybór metod statystycznych użytych do opracowania uzyskanych danych jest właściwy. Duży zakres badań świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki z różnych dyscyplin naukowych. Wskazuje też na duże Jej umiejętności organizacji pracy.

Wyniki badań można łatwo prześledzić dzięki klarownej i logicznej prezentacji w 5 podrozdziałach. W podrozdziale pt. „Środowiskowe uwarunkowania występowania kleszczy” Autorka przeanalizowała zebrany materiał, określiła skład gatunkowy kleszczy i strukturę populacji kleszczy na badanych stanowiskach, dokonała oceny liczebności kleszczy w poszczególnych typach siedliskowych lasu, podsumowała wyniki badań nad zagęszczeniem kleszczy na badanych stanowiskach w różnych miesiącach i latach badań oraz omówiła uwarunkowania środowiskowe występowania kleszczy.

Wyniki przedstawiają osiągnięcia Autorki, która na badanych stanowiskach zebrała 2196 okazów kleszczy (zagęszczenie: 10,1/100 m²) należących do trzech gatunków – *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* i *Haemaphysalis concinna*, wśród których dominował *I. ricinus* (95,3%; 9,6/100 m²). Autorka wykazała różnice w składzie gatunkowym i występowaniu poszczególnych stadiów

rozwojowych oraz w zagęszczeniu kleszczy w różnych typach siedliskowych lasu. Zwróciła uwagę na zbiór larw kleszcza łąkowego *D. reticulatus* z roślinności, co do tej pory było rzadko odnotowywane w literaturze. Analiza danych pozwoliła Doktorantce na stwierdzenie, że na liczebność kleszczy *I. ricinus* była największa w miesiącach maju i czerwcu w lasach mieszanych świeżych i borach mieszanych. Ujemny wpływ na aktywność tego gatunku miała temperatura mierzona na wysokości 1 m nad powierzchnią gruntu.

W kolejnych trzech podrozdziałach Doktorantka przedstawiła wyniki badań molekularnych na obecność patogenów krętków *Borrelia* spp. i genogatunków *B. burgdorferi* s.l. oraz *Rickettsia* spp. Wśród 494 losowo wybranych kleszczy *I. ricinus* 16,8% było zakażonych krętkami, przy czym odsetek zakażonych samic, samców i nimf wynosił odpowiednio 31,6%, 21,6% i 13,6%. Autorka wykazała, że największa częstość występowania infekcji *Borrelia* spp. u kleszczy występuje w borze mieszanym świeżym. Na badanym obszarze wyizolowała cztery genogatunki z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. - *B. afzelii*, *B. garinii*/*B. bavariensis*, *B. valasiana* i *B. lusitaniae* i jeden gatunek spoza tego kompleksu, a mianowicie *B. miyamotoi*. Dominującymi genogatunkami były *B. afzelii* i *B. garinii* u wszystkich stadiów rozwojowych kleszczy i we wszystkich typach siedliskowych lasu. Podobnie jak w przypadku krętków *Borrelia* spp., we wszystkich typach siedliskowych lasu Autorka stwierdziła u kleszczy bakterie *Rickettsia* spp. U aż 43,3% z 494 badanych okazów potwierdziła występowanie DNA *Rickettsia* spp., najczęściej *R. helvetica* (32/35; 91%) i rzadziej *R. monacensis* (3/35; 9%). Około 6,7% badanych kleszczy *I. ricinus* było zainfekowanych dwoma patogenami. Wyniki tych badań wskazują na duże ryzyko zakażenia ludzi i zwierząt patogenami w województwie dolnośląskim i uzasadniają konieczność prowadzenia monitoringu rozprzestrzenienia kleszczy i odkleszczowych patogenów na tym obszarze.

Z treści podrozdziału pt. „Określenie wrażliwości kleszczy wobec środowiskowych izolatów grzybowych” wynika, że z 72 prób gleby wyizolowano 53 szczepy entomopatogennych grzybów z rodzajów *Metarhizium*, *Beauveria* i *Isaria*. Najczęściej były to izolaty grzyba *Metarhizium* (37 szczepów, 69,8%) stwierdzone w każdym typie siedliskowym lasu. Rozprzestrzenienie innych grzybów - *Beauveria* spp. i *Isaria* spp. różniło się w badanych typach siedliskowych. Grzyby z rodzaju *Beauveria* izolowano jedynie z prób gleby z lasu mieszanego świeżego i boru mieszanego świeżego, zaś z rodzaju *Isaria* z lasu mieszanego świeżego. Najwięcej izolatów i największą różnorodność grzybów uzyskano z terenów lasów mieszanych świeżych. Badania molekularne (analiza sekwencji produktu amplifikacji genu ITS4 i ITS5) potwierdziły występowanie w 8 izolatach 3 gatunków grzybów (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* lub *Isaria fumosorosea*). W czterech izolatach oznaczono grzyby do rodzaju. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka do wykonania biotestów użyła własne szczepy entomopatogennych *Metarhizium* (4 szczepy) wyizolowane z prób gleby pobranych lasu świeżego mieszanego i boru świeżego oraz *Beauveria* (2 szczepy) pochodzące z prób z lasu

mieszanego świeżego i boru mieszanego świeżego. Autorka wskazała na skuteczne działanie bójcze grzybowych izolatów na postaci dorosłe i nimfy *I. ricinus*. Obserwowała większą wrażliwość osobników dorosłych (zwłaszcza samic) niż nimf na badane grzyby. Najskuteczniejszy do zwalczania kleszczy okazał się szczep *Metarhizum anisopliae* z lasu mieszanego świeżego. Ważnym dokonaniem Pani mgr Dagmary Dyczko jest określenie stężenia zawiesin zarodników grzybów (cfu/ml) wywołującego efekt letalny u samic, samców i nimf kleszcza *I. ricinus*, LC_{50} i LT_{50} dla badanych szczepów. Te informacje będą mogły być wykorzystane nie tylko w dalszych badaniach naukowych, ale też w praktyce przy opracowywaniu skutecznych biologicznych metod zwalczania kleszczy.

W rozdziale pt. „**Dyskusja**” Pani mgr Dagmara Dyczko omawia własne wyniki w nawiązaniu do osiągnięć innych autorów. Praca jest wieloaspektowa, co wymagało od Doktorantki zapoznania się z obszerną literaturą. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na dużą dojrzałość naukową i szeroką wiedzę Autorki o rozprzestrzenieniu, morfologii, biologii i wymaganiach ekologicznych kleszczy, a także wiedzy o odkleszczowych patogenach i entomopatogennych grzybach występujących w środowisku. Podoba mi się, że Autorka krytycznie odnosi się do własnych wyników i widzi potrzebę kontynuowania swoich badań. Uważam jednak, że w pracy są za mało wyeksponowane własne osiągnięcia, co najprawdopodobniej wynika ze skromności Doktorantki i Jej Promoterek. Zwracam uwagę, że wyniki badań dostarczyły nowej wiedzy o zależnościach pomiędzy kleszczami i patogenami (chorobotwórczymi dla ludzi bakteriami i entomopatogennymi grzybami) w różnych typach siedliskowych lasu. Do ważnych osiągnięć pracy zaliczam też określenie wpływu grzybów na *I. ricinus*, co można wykorzystać do regulacji liczebności populacji tych kleszczy w przyrodzie, a nawet w prognozowaniu ich występowania w różnych typach siedliskowych lasu. Według mojej wiedzy w Polsce badania nad wpływem entomopatogennych grzybów na kleszcze są prowadzone jedynie w Uniwersytecie Wrocławskim.

W rozdziale pt. „**Podsumowanie i wnioski**” w 11 punktach Autorka opisała najważniejsze swoje dokonania naukowe. Wnioski dostarczają odpowiedzi na cele pracy doktorskiej.

Streszczenie w języku polskim i angielskim zawiera wszystkie niezbędne dane o materiale i metodyce badań terenowych i laboratoryjnych, ich wynikach i wnioskach wynikających z badań.

Bibliografia. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki związanej z prowadzonymi badaniami. Obszerne, starannie cytowane piśmiennictwo liczy 325 pozycji. Ponadto Pani mgr Dagmara Dyczko korzystała z 4 źródeł internetowych. Na uznanie zasługuje fakt, że Autorka uwzględniła najważniejsze prace polskich autorów dotyczące tematu Jej badań. Przy końcu pracy doktorskiej Autorka zamieściła załączniki dokumentujące Jej badawczą pracę oraz spis 40 rycin i 26 tabel zamieszczonych w tekście.

W podsumowaniu mojej oceny stwierdzam, że Autorka osiągnęła postawione cele badawcze, a Jej wyniki dostarczają nowych dla nauki danych, które mogą inspirować innych badaczy do dalszych badań. Osiągnięcia Pani mgr Dagmary Dyczko mają też znaczenie aplikacyjne. Wyjątkowy sukces Doktorantki wiąże się przede wszystkim z podjęciem kompleksowych badań przeprowadzonych w terenie i laboratorium z zastosowaniem różnych technik, dzięki którym można poznać jakie zależności występują w różnych układach biologicznych w zróżnicowanych mikrosiedliskach, a także można określić rolę entomopatogennych grzybów w regulacji liczebności populacji kleszczy. Zrealizowanie zadania o tak dużych walorach naukowych jak oceniana praca świadczy o ścisłej współpracy Doktorantki z promotorkami – Panią dr hab. Dorotą Kiewrą i Panią dr Kingą Plewą-Tutaj oraz wskazuje na duże predyspozycje do pracy naukowej. Bardzo wysoko oceniam pracę doktorską za oryginalność podjętego tematu, doskonały warsztat badawczy i dużą wiedzę Autorki pozwalającą na analizę liczego i różnorodnego materiału.

Było dla mnie zaszczytem recenzować pracę doktorską powstałą w ośrodku, którego dynamiczny rozwój obserwuję od wielu lat. Dokonania naukowe zespołu kierowanego najpierw przez Panią Prof. dr hab. Elżbietę Lonc, a następnie Panią dr hab. Dorotę Kiewrę, prof. UWr są bardzo dobrą wizytówką nauki polskiej w świecie.

Praca doktorska Pani mgr Dagmary Dyczko pt. „Wpływ grzybów entomopatogennych na kleszcze jako wektory patogenów w wybranych typach siedliskowych lasu na terenie Dolnego Śląska” spełnia wszystkie wymagania stawiane tego typu opracowaniom. W związku z tym, stawiam wniosek pod adresem Wysockiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych o dopuszczenie Pani mgr Dagmary Dyczko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wartość naukową i praktyczną recenzowanej pracy wnioskuję o przyjęcie jej z wyróżnieniem.

Elżbieta Lonc