UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, dn. 25.07.2023 r.

dr hab. Aleksandra Burkowska-But, prof. UMK
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**RECENZJA**
**rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Bałabańskiego pod tytułem**
**„Drożdże chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka izolowane z plaż piaszczystych użytkowanych rekreacyjnie”**

Przedłożona do oceny praca doktorska Pana mgr. Tomasza Bałabańskiego została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Mykologii na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem dr hab. Anny Biedunkiewicz. Recenzję rozprawy doktorskiej wykonano na zlecenie Dziekana Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Pani prof. dr hab. Iwony Bogackiej, pismem z dnia 30.06.2023 r. Otrzymałam kompletny zestaw dokumentów umożliwiający ocenę rozprawy doktorskiej zgodnie z wymaganiami określonymi w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 t.j ze zm.).

## Ocena tematyki pracy

Grzyby drożdżoidalne należą do najczęstszych czynników etiologicznych wielu chorób grzybiczych; mogą zasiedlać skórę, błony śluzowe i narządy wewnętrzne człowieka w różnych okresach rozwoju osobniczego, czekając na odpowiedni moment do rozwoju, którym jest naruszenie równowagi biologicznej organizmu (Ejdys 2001). Jeden z najważniejszych rezerwuarów drożdży chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka stanowią zbiorniki wodne. Badania mikologiczne potwierdzają stałą obecność mikrogrzybów, w tym drożdży, w różnych ekosystemach wodnych. Jednocześnie ocenia się, że z puli drożdży występujących w środowisku wodnym nawet ok. 200

gatunków może stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka (Kurtzmann i in. 2011, Biedunkiewicz i in. 2013, Biedunkiewicz i Góralska 2016). Liczebność drożdży w zbiornikach wodnych jest determinowana przez liczne czynniki, ale wyraźnie wzrasta proporcjonalnie do antropopresji i postępującej degradacji środowiska. Woda, a także piasek na plażach użytkowanych rekreacyjnie niewątpliwie stanowią ważne elementy łańcucha epidemiologicznego zakażeń grzybiczych (Biedunkiewicz i Ozimek 2009; Biedunkiewicz i Góralska 2016). Mikroorganizmy krążą pomiędzy poszczególnymi składowymi ekosystemu jeziornego - piaskiem plaż, wodą i przybrzeżną fyllosferą.

Niewątpliwie jako potencjalny wektor drożdży, w tym potencjalnie chorobotwórczych, należy rozpatrywać ludzi. Mimo to, w przypadku ekosystemów jeziornych wykorzystywanych rekreacyjnie, zgodnie z regulacjami polskich aktów prawnych oraz dyrektywami Parlamentu Europejskiego, kontroli mikrobiologicznej podlega jedynie woda, a w zakres tych badań nie wchodzą drożdże.

Pomimo przedstawionych powyżej zagrożeń zdrowotnych związanych z potencjalną obecnością drożdży (w tym patogennych) w środowisku ekosystemów jeziornych wykorzystywanych rekreacyjnie, dane na temat zbiorowisk drożdży w piasku plażowym są bardzo ubogie - zwykle ograniczone do określenia składu gatunkowego i liczebności mikrogrzybów w piasku. Brakuje również norm referencyjnych dotyczących czystości mykologicznej piasku plażowego. Normy z zakresu oceny bezpieczeństwa zdrowotnego kąpielisk obejmują jedynie parametry bakteriologiczne, chemiczne i fizyczne, a także dotyczą głównie wody kąpieliskowej, z pominięciem piasku plażowego.

Należy zatem stwierdzić, że podjęte przez mgr. Tomasza Bałabańskiedo badania i otrzymane wyniki stanowią bogate źródło informacji na temat piasku plażowego jako niszy ekologicznej oraz pozwalają na wieloaspektową analizę populacji drożdży związanych z tym środowiskiem. Co istotne, w badaniach uwzględniono potencjał chorobotwórczy wyizolowanych gatunków, co pozwala na analizę uzyskanych wyników w kontekście zdrowia publicznego i bezpieczeństwa rekreacyjnego korzystania z plaż. Podjęta w ocenianej dysertacji problematyka obecności drożdży chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka izolowanych z plaż piaszczystych użytkowanych rekreacyjnie jest aktualna, ważna i mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Szczególnie cenne jest uwzględnienie w pracy określenia biobezpieczeństwa pozyskanych izolatów drożdży i określenie ich potencjału chorobotwórczego, a także rozszerzenie zakresu badań o piasek boisk do siatkówki plażowej.

Biedunkiewicz A., Góralska K. (2016) *Microfungi potentially pathogenic for humans reported in surface waters utilized for recreation*. Clean – Air, Soil, Water, 44(6): 559-609

Biedunkiewicz A., Dynowska M., Ejdys E., Sucharzewska E. (2013) *Species diversity of yeast-like fungi in some eutrophic lakes in Olsztyn*. Acta Mycol., 48: 61-71

BiedunkiewiczA., Ozimek T. (2009*) Qualitative and quantitative changes of potentially pathogenic fungi in hydrophyte wastewater treatment plant (case study in Nowa Słupia, Poland)*. Pol. J. Environ. Stud., 18:161–166.

Ejdys E. (2001). *Środowisko szkolne jako potencjalne miejsce transmisji międzyosobniczych.* Wiad. Parazyt., *47*(3): 353-358

Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (2011) *The yeasts: a taxonomic study,* 5th ed. Elsevier, Tokyo

## Ocena formalna pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest zwartą obszerną monografią w języku polskim, która liczy 242 strony, w tym 40 stron załączników. Podział pracy na rozdziały jest typowy dla rozprawy doktorskiej.

Praca obejmuje: jednostronicowe streszczenia w języku polskim oraz angielskim, wstęp (21 stron) zawierający również uzasadnienie wyboru tematu i sformułowanie celu badań, opis materiału i metod badań (17 stron), opis wyników uzyskanych w trakcie badań (98 stron), dyskusję (22 strony), wnioski (3 strony), spis literatury obejmujący 215 pozycji oraz spis tabel, rycin, tablic i załączników. W pracy zamieszczono 37 tabel, 43 ryciny oraz 24 tablice.

Podział na tablice i ryciny jest moim zdaniem trochę sztuczny, bo różnego rodzaju fotografie (np. pobierania materiału z plaży świdrem glebowym oraz badanych boisk do siatkówki plażowej) znajdują się w obu kategoriach materiałów graficznych. Wszystkie tabele, ryciny, tablice oraz załączniki są czytelne i na ogół poprawnie opisane. Szczegółowe zastrzeżenia zostały opisane w rozdziale *„Uwagi polemiczne i dyskusyjne”* niniejszej recenzji. Uzupełnienie pracy stanowi 14 załączników, zawierających m.in. zgody administratorów badanych kąpielisk na przeprowadzenie badań, zestawienia warunków meteorologicznych czy wykaz zidentyfikowanych gatunków. Niestety kolejność załączników wydaje się być trochę przypadkowa.

Praca została przygotowana starannie pod względem edytorskim, jest napisana poprawnym, zrozumiałym językiem naukowym. Jedynie próba przeanalizowania i opisania wszystkich uzyskanych wyników pod każdym możliwym względem jest pewnym utrudnieniem dla czytelnika – łatwo pogubić się w gąszczu informacji i nie wyłowić tych najistotniejszych.

**Ocena merytoryczna pracy**

Rozdział *Wstęp* ocenianej dysertacji dobrze wprowadza w tematykę pracy. Autor przybliża charakterystykę ekologiczną i fizjologiczną mikrogrzybów, w tym drożdży, szczególnie w kontekście ich potencjalnej chorobotwórczości. Opisuje czynniki predysponujące do zachorowania na grzybice, uwzględniając w tym specyficzne czynniki związane z intensywnym uprawianiem sportu, jak i porusza bardzo istotny problem trudności w leczeniu mykoz, związanych z zarówno naturalną opornością drożdży na poszczególne leki, mechanizmami nabywania oporności oraz niebezpieczeństwem związanym z pojawianiem się szczepów wielolekoopornych, ale także z trudnościami w opracowywaniu nowych, mniej toksycznych względem komórek ludzkich, leków przeciwgrzybowych. W kolejnym podrozdziale Autor wprowadza w zagadnienia związane z występowaniem mikrogrzybów, w tym drożdży w poszczególnych elementach ekosystemu jeziornego, uwzględniając glebę, piasek, fyllosferę oraz wodę, a także podkreśla rolę antropopresji w procesie transmisji drożdży pomiędzy tymi środowiskami. Opisywane zagadnienia konsekwentnie prowadzą do wyłonienia celu pracy, jakim było określenie składu gatunkowego i ilościowego populacji drożdży potencjalnie chorobotwórczych i chorobotwórczych dla człowieka, obecnych w piasku nadzorowanych i nienadzorowanych plaż oraz boisk do siatkówki plażowej, położonych przy wykorzystywanych do rekreacji kąpieliskach miejskich, nad brzegami jezior na terenie miasta Olsztyn i przedstawienia zadań badawczych przyjętych do realizacji tego celu. W opisie zadań badawczych moim zdaniem zabrakło zadania/zadań związanych z badaniami ilościowymi, które w opisie wyników oraz w dyskusji zajmują znaczące miejsce.

W opisie metodyki Autor bardzo dokładnie charakteryzuje ujęte w badaniach jeziora, plaże i boiska do siatkówki plażowej. Atrakcyjny dodatek, w pełni uzasadniony merytorycznie, stanowią zdjęcia stanowisk badawczych. Schemat poboru próbek jest jasny i uzasadniony, ale ocena parametrów meteorologicznych mogłaby być wzbogacona w parametry dotyczące samego piasku. Moim zdaniem szczególnie cenne w doborze metod jest połączenie i uzupełniające zastosowanie metod z zakresu klasycznej mykologii (izolacja drożdży na podłożu stałym, mikrohodowle na agarze Nickersona, ocena zdolności fermentacyjnych, obserwacji mikroskopowe) z technikami molekularnymi (sekwencjonowanie fragmentów ITS-1 i ITS-4 DNA). Istotne jest również to, że Autor nie tylko zidentyfikował wyizolowane drożdże, ale także ocenił ich potencjał infekcyjny stosując wskaźniki BSL (BioSafety Levels).

Obszerny opis wyników dotyczących identyfikacji wyizolowanych drożdży jest słusznie podzielony na części. Wyodrębniono m.in. część dotyczącą analiz molekularnych, analizę porównawczą składu gatunkowego drożdży w piasku plaż poszczególnych jezior,

odrębnie opisano również strukturę taksonomiczną drożdży wyizolowanych z boisk do siatkówki plażowej. Oddzielnie opisano wyniki badań ilościowych oraz analiz statystycznych. Rozdział *Wyniki* został wzbogacony o bardzo bogatą, interesującą i staranie przygotowaną dokumentację fotograficzną.

W opisach zastosowano niekiedy niepoprawne językowo skróty myślowe i niefortunne sformułowania (np. „czerwiec charakteryzowała…", „…zmienne trendy w zmianie liczby…"). Uważam też, że niepotrzebnie w wielu miejscach Autor powielał słownie opis danych możliwych do zanalizowania na wykresach lub w tabelach. Niektóre tabele (np. 14, 15, 17, 18, 28, 30, 32) zawierają zbędne kolumny – tytuły tych tabel z założenia wykluczają wyizolowanie umieszczonych w tabeli gatunków w innym niż opisywane środowisku, więc kolumny z samymi zerami nic nie wnoszą do przedstawienia wyników.

Porównanie wyników własnych z danymi przedstawionymi przez innych autorów, pomimo ubogiego materiału porównawczego, Autor ocenianej dysertacji przedstawił wyjątkowo sprawnie. Odwołania dotyczą głównie najnowszych badań opublikowanych w ostatnich latach. Wiele z nich to artykuły opublikowane w latach 2020-22, co świadczy o aktywnym zainteresowaniu Autora i śledzeniu na bieżąco literatury naukowej dotyczącej struktury zbiorowisk drożdży w piasku plaż. Za szczególnie cenny element rozdziału *Dyskusja* uważam dokonanie przeglądu literatury pod kątem potwierdzenia przypadków infekcji powodowanych przez drożdże najczęściej izolowane z badanych plaż i boisk.

Na podstawie wykonanych badań mgr Tomasz Bałabański przedstawił 8 wniosków. Moim zdaniem są one sformułowane poprawnie oraz zwracają uwagę na najważniejsze i najpilniejsze do rozwiązania problemy związane z obecnością drożdży potencjalnie chorobotwórczych w piasku plaż i boisk do siatkówki plażowej:

- konieczność monitoringu nie tylko wód kąpielisk, ale także piasku plaż;
- potrzebę opracowania referencyjnych norm dotyczących czystości mykologicznej kąpielisk, w tym plaż;
- konieczność zachowania czujności z powodu procesów klimatycznych, które mogą prowadzić do zmian struktury liczbowej i taksonomicznej drożdży w piasku;
- zasadność prowadzenia odpowiednich działań prewencyjnych i informacyjnych przez organy nadzorujące plaże;
- możliwość łącznego stosowania klasycznych i molekularnych metod laboratoryjnych jako „złotego standardu" w laboratoriach mykologicznych.

**Ocena znajomości literatury dotyczącej problematyki badań**

Bogato udokumentowana literatura zawierająca aż 215 pozycji, sposób jej doboru, aktualność i zróżnicowanie (artykuły naukowe z renomowanych czasopism, akty prawne i normatywne, klucze diagnostyczne) wskazuje na dogłębną znajomość podjętego tematu. 30% zacytowanych pozycji to artykuły wydane w ostatnich 5 latach. Szczególnie w rozdziale *Dyskusja* uwzględniono najnowsze doniesienia naukowe i pomimo ograniczonych danych literaturowych dyskusję wyników Autor przeprowadził bardzo sprawnie. Cytowane pozycje są zgodne z problemem badawczym podjętym w ocenianej rozprawie i ich wykorzystanie jest w pełni uzasadnione merytorycznie.

**Przydatność uzyskanych wyników w praktyce**

Doktorant przedstawił bardzo obszerne wyniki dotyczące składu gatunkowego, liczebności oraz potencjalnej chorobotwórczości grzybów drożdżoidalnych obecnych w piasku plaż oraz boisk do siatkówki plażowej zlokalizowanych na terenie Olsztyna. Dostępne w literaturze dane z zakresu charakterystyki ekologicznej i taksonomicznej drożdży w piasku plaż są ograniczone. Uzyskane wyniki - powszechne i liczne występowanie gatunków potencjalnie patogennych dla człowieka, zakwalifikowanych do drugiego poziomu biobezpieczeństwa (BSL-2) - jednoznacznie wskazują na potrzebę prowadzenie stałego monitoringu sanitarno-epidemiologicznego piasku plaż i boisk do siatkówki plażowej. Innowacyjny i aplikacyjny charakter pracy zdecydowanie zwiększa wzbogacenie materiału do analiz o piasek boisk do siatkówki plażowej. Przedstawione w ocenianej dysertacji wyniki mogą z cała pewności stanowić bazę do opracowania działań prewencyjnych, ograniczających zagrożenia związane z obecnością drożdży potencjalnie patogennych, polegających na regularnym oczyszczani i uzupełnianiu piasku plaż i boisk do siatkówki plażowej. Udostępnienie uzyskanych wyników organom nadzorującym kąpieliska może przyczynić się do przygotowania i przeprowadzenia kampanii informacyjnych na temat mykologicznych zagrożeń związanych z użytkowaniem plaż i boisk oraz promujących zachowanie zasad higieny podczas korzystania z tych obiektów.

Ponadto poprzez skuteczne połączenie w badaniach metod klasycznych (mikrohodowli na agarze Nickersona) z zastosowaniem technik molekularnych Doktorant wykazał, że synergiczne stosowanie klasycznych i molekularnych metod laboratoryjnych zwiększa prawdopodobieństwo identyfikacji gatunkowej drożdży i powinno stanowić „złoty standard” w laboratoriach mykologicznych.

**Uwagi polemiczne i dyskusyjne**

1. Szczególnie w rozdziale Wstęp, doktorant zdecydowanie zbyt często posługuje się określeniem „unikalny" (nie do końca poprawnym językowo) oraz bardziej poprawnym „unikatowy" w odniesieniu do właściwości drożdży (np. plastyczności środowiskowej), które moim zdaniem szczególne, czy też niepowtarzalne nie są, ponieważ są powszechne chociażby u bakterii i archeonów obecnych w opisywanych środowiskach.

2. W opisie metodyki Autor podaje, że „Materiał do badań stanowiły drożdże wyizolowane w dwóch sezonach letnich (od kwietnia do października 2019 i 2020 roku)", natomiast opisując wyniki, zarówno w tekście, jak i w tabelach oraz na rycinach stosowany jest zapis „sezon 2018-2019, sezon 2019-2020", co wprowadza czytelnika w błąd.

3. Na rycinach 21, 29, 26, 32 i 35 połączenie punktów wskazuje, że chodzi o wartości zmienne w czasie w sposób ciągły, a przecież nie można uznać za ciągłe wartości dla liczby izolatów pozyskanych w danym miesiącu na głębokości 10 i 50 cm. Podobna uwaga dotyczy ryciny 39 – średnia liczba żywych komórek drożdży w 1 g piasku poszczególnych jezior to nie jest wartość zmieniająca się w sposób ciągły, między jeziorami.

4. Wykazano istotny statystycznie wpływ temperatury powietrza na średnią koncentrację szczepów w piasku. Czy w trakcie badań sprawdzono zależność/różnicę pomiędzy temperaturą powietrza (którą uznano za parametr wpływający na potencjalną zmienność liczby izolatów i koncentracji drożdży w piasku), a temperaturą piasku, szczególnie na głębokości 50 cm? Również pozostałe czynniki meteorologiczne (wskaźnik UV, wilgotność powietrza) determinują warunki tylko w powierzchniowej warstwie piasku, a w głębszych warstwach istotniejsze byłoby zmierzenie np. wilgotności piasku.

5. Autor bardzo słusznie podkreślił we wnioskach, że konieczne jest prowadzenie stałego monitoringu sanitarno-epidemiologicznego piasku plaż i boisk do siatkówki plażowej oraz zwrócił uwagę na brak regulacji prawnych określających normy referencyjne z zakresu czystości mykologicznej piasku. Uważam, że wskazane było by również zaproponowanie analiz (ilościowych, jakościowych), które powinny być ujęte w takim monitoringu.

**Ocena końcowa**

Pan mgr Tomasz Bałabański wykazał się dużą, ugruntowaną wiedzą w dyscyplinie nauki biologiczne, o czym świadczą wyniki badań przedstawionych w ocenianej dysertacji. Doktorant osiągnął założone cele pracy realizując wszystkie konieczne do tego zadania badawcze. Zastosowane metody potwierdzają opanowanie przez Doktoranta trudnego, szczególnie w zakresie klasycznej identyfikacji drożdży, warsztatu badań mykologicznych. Uzyskane wyniki wnoszą wiele nowych cennych informacji dotyczących liczebności, składu gatunkowego i potencjału chorobotwórczego drożdży obecnych w piasku plaż, w tym boisk do siatkówki plażowej. Wszelkie zamieszczone w recenzji uwagi krytyczne nie umniejszają wartości ocenianej rozprawy. Wyniki są oryginalne, mają duże znaczenie praktyczne i wskazują na potrzebę stałego monitoringu sanitarno-epidemiologicznego piasku plaż, a szczególnie piasku na boiskach używanych do siatkówki plażowej.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska przygotowana przez Pana mgr. Tomasza Bałabańskiego spełnia w mojej opinii warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 t.j ze zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr. Tomasza Bałabańskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Aleksandra Burkowska - But

dr hab. Aleksandra Burkowska-But, prof. UMK