Łódź, dnia 14.11.2023 r.

Dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Kamili Kuleszy
„Drożdże izolowane ze śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.) poławianego do celów konsumpcyjnych"

Podstawą formalną sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej, Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne, z dnia 16.10.2023 r., w którym zostałam poinformowana o powierzeniu mi funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Kamili Kuleszy zatytułowanej „Drożdże izolowane ze śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.) poławianego do celów konsumpcyjnych"

Ocena formalna

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Kamili Kuleszy została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Mykologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem dr hab. Anny Biedunkiewicz.

Praca została przygotowana w formie monografii, z zachowaniem struktury zgodnej z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim. Tytuł

042 635 41 48
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
sylwia.rozalska@biol.uni.lodz.pl

dysertacji jest zgodny z jej treścią merytoryczną. W rozprawie Autorka zamieściła streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel badań i hipotezy badawcze, opisała wykorzystywany materiał i stosowane przez nią metody, jak również wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, spis tabel, rycin, tablic i załączników oraz załączniki. Całość dysertacji obejmuje 197 stron.

Wstęp do dysertacji obejmuje sześć podrozdziałów wprowadzających w wyczerpujący sposób w problem, który Doktorantka zamierza rozwiązać. W części dotyczącej omówienia celu badawczego mgr Kulesza sformułowała dwie hipotezy badawcze, jasno przedstawiła cel badań i sześć zaplanowanych do wykonania zadań badawczych. Wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej zostały przedstawione w atrakcyjnej i przejrzystej formie graficznej i szczegółowo opisane.
W rozdziale Dyskusja Doktorantka interpretuje uzyskane wyniki oraz przeprowadza ich analizę w kontekście istniejącej literatury naukowej. Piśmiennictwo, na które powołuje się mgr Kamila Kulesza jest dobrze dobrane i merytorycznie uzasadnione. W końcowej części pracy Doktorantka przedstawia wnioski wynikające z przeprowadzonych badań, implikacje jakie mają uzyskane wyniki oraz sugeruje możliwe rozwiązania zaobserwowanego przez nią problemu.

Monografia stanowiąca podstawę rozprawy doktorskiej została napisana poprawnie pod względem gramatycznym, stylistycznym i leksykalnym i stanowi bardzo uporządkowane opracowanie charakterystyczne dla tego typu prac naukowych.

Ocena merytoryczna

Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Tematyka badawcza pracy doktorskiej mgr Kuleszy dotyczy interesującego zagadnienia jakim jest mykobiota ryb żyjących w środowiskach słonych.

Wszystkie kręgowce, w tym ryby, mogą być zasiedlane przez grzyby mikroskopijne o zróżnicowanym statusie troficznym i taksonomicznym. Jednak ryby słonowodne są rzadko opisywane jako nosiciele drożdży workowych i podstawkowych. Należy podkreślić, że większość dostępnych danych literaturowych dotyczy występowania drożdży u osobników chorych lub żyjących w akwakulturach słodkowodnych. Poszerzenie wiedzy na temat różnorodności gatunkowej drożdży izolowanych z ontocenoz zdrowych osobników ryb słonowodnych, zwłaszcza

042 635 41 48
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
sylwia.rozalska@biol.uni.lodz.pl

gatunków poławianych do celów konsumpcyjnych, wydaje się być zagadnieniem istotnym i wymagającym szerszych badań. Dane literaturowe sugerują, że zbiorniki wodne mogą stanowić jeden z największych rezerwuarów grzybów chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka. Szacuje się, że wśród licznie występujących w środowisku wodnym drożdży, około 200 gatunków to patogeny.

Istotę tej problematyki Doktorantka opisuje w 20 stronnicowym wstępie cytując aktualne doniesienia literaturowe dotyczące przedstawionej problematyki badawczej. Następnie mgr Kulesza definiuje hipotezy i cel badawczy rozprawy, który brzmi: „Ocena różnorodności gatunkowej drożdży kolonizujących różne ontocenozy zdrowych osobników śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.), poławianego do celów konsumpcyjnych, z uwypukleniem metod identyfikacji i właściwości biochemicznych wyizolowanych mikrogrzybów". Do realizacji zamierzonego celu Doktorantka zaproponowała 6 zadań badawczych, które obejmują: (I) Określenie zróżnicowania taksonomicznego drożdży w badanych ontocenozach poprzez identyfikację tych grzybów metodami klasycznymi i molekularnymi. (II) Wyselekcjonowanie izolatów należących do konkretnych gatunków i ich identyfikację komercyjnymi testami. (III) Ocenę skuteczności identyfikacji wybranych izolatów drożdży na podstawie zdolności do asymilacji węglowodanów z wykorzystaniem testów API 20C AUX. (IV) Ocenę aktywności enzymatycznej wybranych izolatów z wykorzystaniem testów API ZYM. (V) Ocenę lekowrażliwości wybranych izolatów przy użyciu testów ATB FUNGUS 3. (VI) Ocenę zdolności drożdży do wzrostu w temperaturze 37°C.

Materiały i metody oraz wyniki są zaprezentowane w sposób przejrzysty. Doktorantka dokładnie opisała zastosowane metody i techniki badawcze, które posłużyły do realizacji poszczególnych etapów badań. Należy podkreślić, że metody są dobrane w sposób odpowiedni, umożliwiający przeprowadzenie kompleksowych badań, w wyniku których mgr Kamila Kulesza uzyskała szereg wyników umożliwiających jej identyfikację drożdży izolowanych z ontocenoz śledzia bałtyckiego. Wybór metod badawczych uważam za trafny i świadczący o umiejętności Doktorantki do rozwiązywania określonego problemu badawczego.

W kolejnej części rozprawy mgr Kamila Kulesza opisała uzyskane wyniki w sposób prawidłowy, a znaczną część tego rozdziału stanowi dokumentacja w postaci Tabel i Rycin. Doktorantka bardzo dokładnie przeanalizowała i omówiła efekty

042 635 41 48
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
sylwia.rozalska@biol.uni.lodz.pl

przeprowadzonych badań. Uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje na temat mykobioty ryb słonowodnych oraz poszerzają wiedzę na temat różnorodności gatunkowej drożdży izolowanych z ontocenoz zdrowych osobników śledzi bałtyckich, poławianych do celów konsumpcyjnych.

Równie wysoko oceniam rozdział Dyskusja, w której Autorka w dojrzały sposób komentuje uzyskane przez siebie wyniki porównując je do danych literaturowych i omawia ich potencjalne znaczenie praktyczne, co świadczy o obszernej wiedzy mgr Kamili Kuleszy w tematyce rozprawy.

Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej i ich znaczenie

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pani mgr Kuleszy zaliczam:

1. Wykazanie, powszechnego występowania drożdży w ontocenozach zdrowych osobników śledzia bałtyckiego oraz komensalicznego charakteru relacji „mikro-makroorganizm".
2. Wyizolowanie z populacji zdrowych śledzi drożdży, które są potencjalnie patogenne dla zwierząt i ludzi, co sugeruje możliwe zagrożenie ze strony tych grzybów dla ryb i ich konsumentów.
3. Sugestię, że drożdże *Debaryomyces hansenii* i *Pichia kudriavzevii* mogą stanowić rdzenną mykobiotę śledzi bałtyckich. Natomiast *Candida parapsilosis* oraz gatunki z rodzajów *Apiotrichum* i *Yarrowia* mogą być mykobiotą przejściową śledzi.
4. Wykazanie zdolności większości izolatów drożdży pozyskanych ze śledzi do wzrostu w temperaturze 37°C co sugeruje, że mogą one być potencjalnymi antropopatogenami

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania oraz uzyskane wyniki poszerzają wiedzę naukową dotyczącą zróżnicowania grzybów mikroskopowych w ontocenozach ryb zamieszkujących środowiska słone. Ponadto, otrzymane w dysertacji wyniki są niezwykle istotne i wskazują na konieczność prowadzenia monitoringu mykologicznego zarówno ryb przeznaczonych do spożycia, jak i środowiska morskiego, które może stanowić źródło kontaminacji chorobotwórczymi grzybami.

Podsumowując, dysertacja mgr Kamili Kuleszy stanowi zbiór interesujących wyników dotyczących występowania drożdży chorobotwórczych i potencjalnie

chorobotwórczych dla ludzi w ontocenozach śledzia bałtyckiego. Podczas realizacji pracy doktorskiej, Doktorantka przeprowadziła zaplanowane eksperymenty przy użyciu zróżnicowanych technik, co umożliwiło uzyskanie znaczących i wartościowych wyników.

Podczas analizy rozprawy nasunęły mi się pewne sugestie i uwagi, które w tym miejscu chciałabym przytoczyć.

1. W części „Wstęp", na str. 10, Doktorantka wymienia cechy charakterystyczne wszystkich grzybów. Jednak nie wspomina o najważniejszej, jaką jest zdolność tych mikroorganizmów do produkcji enzymów zewnątrzkomórkowych. Cecha ta jest charakterystyczna dla grzybów i umożliwia im trawienie pozakomórkowe. Ponadto, w opisie brakuje informacji o obecności ergosterolu w osłonach komórkowych drożdży oraz o występowaniu aparatu Golgiego bez dictiosomu.
2. We „Wstępie" Doktorantka charakteryzuje układ odpornościowy ryb i wspomina o odporności nabytej, do której można zaliczyć wytwarzanie immunoglobulin. Jednak większość z omawianych drożdży to komensale, tak więc zachodzi pytanie czy jest możliwe wytworzenie przeciwciał skierowanych przeciwko gatunkom komensalicznym?
3. Czy tytuł rozdziału „3.2. Badania kontynuowane" jest sformułowany właściwie? W zasadzie są do główne badania ocenianej rozprawy doktorskiej.
4. Na str. 33 dysertacji Autorka opisuje sposób zabezpieczania izolatów drożdży polegający na zamrożeniu komórek w temperaturze -20°C. Jaka była przeżywalność komórek podczas takiego przechowywania? Czemu nie stosowano tradycyjnie wykorzystywanego w takich sytuacjach glicerolu?
5. Doktorantka podaje, że w p. 4.3. wykonano uzupełniające badania biochemiczne dla gatunków z rodzaju *Apiotrichum*. Czemu nie przeprowadzono takich badań dla innych gatunków np. *Meyerozyma* sp.?
6. W rozprawie (w tym w podpisach do drzew filogenetycznych) Autorka wielokrotnie wspomina o analizach sekwencji nukleotydowych regionu ITS5. Czy Autorka ma na myśli starter ITS5? Proszę o wyjaśnienie, który dokładnie region został zsekwencjonowany.

042 635 41 48
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
sylwia.rozalska@biol.uni.lodz.pl

7. Na str. 116 w pierwszym akapicie autorka przedstawia tezę: „Wydaje się więc, że *C. parapsilosis*, *D. hansenii* i *M. guilliermondii*, mimo tego, iż zostały uznane przez RAGHUKUMAR (2017) za symbionty, mogą być gatunkami potencjalnie chorobotwórczymi dla ryb.". Czy są doniesienia literaturowe wskazujące na potencjał chorobotwórczy tych gatunków u ryb słonowodnych?
8. Na str. 122 Doktorantka twierdzi, że „...techniki biologii molekularnej nie zawsze są dostępne w rutynowej identyfikacji i we wszystkich laboratoriach diagnostycznych (PETTI 2007; CRISEO i in. 2015).", cytując przy tym dość stare dane literaturowe. Czy w ostatnim czasie sytuacja się nie poprawiła? Podobnie na str. 125 „...Występowanie tych samych drożdży w surowcu i przetworach śledziowych może świadczyć o tym, że procesy wykorzystywane w zakładach przetwórczych nie są do końca skuteczne,...". W ostatnich latach zmieniły się nie tylko maszyny wykorzystywane do procesów technologicznych, ale też zaostrzono wymagania dotyczące czystości mikrobiologicznej żywności. Proszę o komentarz w tej sprawie.
9. Na str. 128 Doktorantka pisze, że wrodzoną oporność drożdży na środki przeciwgrzybicze można przewidzieć na podstawie określenia gatunku grzyba. Tu nasuwają się pytania do dyskusji (I) jakie antymykotyki są dopuszczone do stosowania u ryb, zwłaszcza tych słonowodnych? (II) czy identyfikacja do gatunku ma rzeczywiście w tym przypadku sens, jeśli stosowane są antymykotyki o szerokim spektrum działania?
10. W pierwszym Wniosku rozprawy Doktorantka sugeruje, że identyfikacja drożdży powinna być dokonywana na podstawie metod klasycznych (morfologicznych i biochemicznych) oraz molekularnych. Jeśli do identyfikacji tych grzybów nie będą stosowane powszechnie dostępne testy komercyjne API, to czy nie byłoby słuszne zastosowanie większej liczby lub bardziej specyficznych markerów molekularnych? Bardzo proszę o opinię na ten temat.

Przedstawione uwagi nie wpływają na mój pozytywny odbiór rozprawy doktorskiej.

042 635 41 48
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
sylwia.rozalska@biol.uni.lodz.pl

Konkluzja końcowa

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Kamili Kuleszy przedstawia szeroko zakrojone i bardzo dobrze zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej wysoki poziom merytoryczny. Doktorantka zaprezentowała bardzo dobrą znajomość problematyki rozprawy, wykazała umiejętność samodzielnego wykonywania badań naukowych, opanowała warsztat badawczy oraz wykazała się zdolnością do omówienia i interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.), w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr Kamili Kuleszy do dalszych etapów postepowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie, że względu wysoki poziom merytoryczny, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Sylwia Różalska

Dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ

042 635 41 48
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
sylwia.rozalska@biol.uni.lodz.pl