

Łódź, dnia 28.07.2023 r.

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

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Bałabańskiego „Drożdże chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka izolowane z plaż piaszczystych użytkowanych rekreacyjnie”

Podstawą formalną sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne, z dnia 25.05.2023 r., w którym zostałam poinformowana o powierzeniu mi funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Bałabańskiego zatytułowanej „Drożdże chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka izolowane z plaż piaszczystych użytkowanych rekreacyjnie”

Ocena formalna

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

Praca przygotowana jest w formie monografii, której struktura jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim. Tytuł pracy doktorskiej odpowiada jej zawartości merytorycznej. W rozprawie Autor zamieścił

042 635 41 48

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

sylwia.rozalska@biol.uni.lodz.pl

uni.lodz.pl

streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, bibliografię, spis tabel, rycin, tablic i załączników oraz załączniki. Wśród 14 załączników znajdują się m.in. dane udostępnione przez Dyрекcję Ośrodka Sportu i Rekreacji w Olsztynie dotyczące użytkowania badanych plaż. Całość dysertacji obejmuje 242 strony.

Wstęp do dysertacji jest kompletny i wprowadza w problem, który Doktorant zamierza rozwiązać. W części dotyczącej omówienia celu naukowego Doktorant uzasadnił wybór tematu badawczego, jasno przedstawił cel badań jak również przedstawił zaplanowane do wykonania zadania badawcze (str. 28-29). Wyniki zostały opisane w bardzo szczegółowy sposób i przedyskutowane w rozdziale Dyskusja. Piśmiennictwo, na które powołuje się mgr Tomasz Bałabiński w dysertacji, obejmuje najnowsze pozycje literaturowe w prezentowanym temacie, jest dobrze dobrane i merytorycznie uzasadnione. W końcowej części pracy Autor przedstawia nie tylko wnioski wynikające z przeprowadzonych badań, ale także sugeruje możliwe rozwiązania problemu i przedstawia dalsze możliwości kontynuowania zapoczątkowanych przez niego badań.

Monografia stanowiąca podstawę rozprawy doktorskiej została napisana poprawnie pod względem stylistycznym leksykalnym i gramatycznym. Ponadto, stanowi bardzo uporządkowane opracowanie właściwe pracom naukowym.

Ocena merytoryczna

Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Tematyka badawcza ocenianej pracy doktorskiej dotyka niezwykle istotnego problemu jakim jest pojawianie się grzybów chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych dla ludzi w piasku plaż zlokalizowanych nad jeziorami użytkowymi rekreacyjnie.

Grzyby mikroskopowe, do których zaliczane są także drożdże, są zdolne do sprawnego przystosowywania się do warunków panujących w danym środowisku. Kluczową rolę w tych zdolnościach adaptacyjnych odgrywa mechanizm odżywiania oparty na osmotrofii pierwotnej oraz heterogeniczny zestaw enzymów zewnątrzkomórkowych. Dzięki unikatowym właściwościom, drożdże są zdolne do zasiedlania większości ekosystemów biosfery, ale niestety niektóre gatunki są organizmami chorobotwórczymi lub potencjalnie chorobotwórczymi dla ludzi.

Zdolności adaptacyjne tych grzybów umożliwiają im zasiedlanie także obszarów zmienionych antropogenicznie.

W literaturze naukowej są obecne jedynie nieliczne doniesienia dotyczące występowania drożdży w ekosystemach jeziornych, co podkreśla wagę i istotę problemu podjętego w dysertacji. Grzyby te, podobnie jak inne mikroorganizmy, krążą sezonowo pomiędzy poszczególnymi składowymi ekosystemu jeziornego, do którego zaliczamy: piasek plaż, wodę i przybrzeżną fyllosferę. Istotny wpływ na cyrkulację grzybów mikroskopowych w zbiornikach wodnych ma również działalność człowieka, który wprowadza do ekosystemu jeziornego gatunki allochtoniczne. Z uwagi na naturalny związek aktywności ludzi ze zbiornikami wodnymi należy ich rozpatrywać jako potencjalny wektor tych drobnoustrojów.

Struktura taksonomiczna drożdży w ekosystemach wodnych oraz glebowych jest bardzo zróżnicowana. Obejmuje wiele gatunków, zaklasyfikowanych zarówno do gromady Ascomycota (grzyby workowe), jak i Basidiomycota (grzyby podstawkowe).

Dane literaturowe sugerują, że środowisko zbiorników wodnych może 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. Zarówno woda jak i plaże użytkowane rekreacyjnie stanowią istotny element łańcucha epidemiologicznego mykoz. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w przypadku ekosystemów jeziornych jedynie woda podlega kontroli mikrobiologicznej, ale niestety kontrola ta nie obejmuje oznaczania obecności grzybów mikroskopowych. O istocie tej problematyki Doktorant pisze w 23 stronicowym wstępie, cytując przy tym prace dotyczące przedstawionej problematyki badawczej, w tym te najbardziej aktualne. Następnie Doktorant definiuje cel badawczy rozprawy, który brzmi: „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”. Do realizacji zamierzonego celu Doktorant zaproponował 6 zadań badawczych, które obejmują: (I) Pozyskanie izolatów grzybów z wybranych stanowisk plaż piaszczystych kąpielisk miejskich i boisk do siatkówki plażowej na dwóch głębokościach (10 i 50 cm). (II) Weryfikacja izolatów drożdży, od izolatów bakterii i

grzybów strzępkowych. (III) Ocena aktywności enzymatycznej oraz cech makro- i mikromorfologicznych pozyskanych izolatów drożdży. (IV) Przeprowadzenie lub zlecenie analiz molekularnych, obejmujących: izolację genomowego DNA, amplifikację fragmentów DNA oraz sekwencjonowanie fragmentów ITS-1 i ITS-4 DNA wybranych izolatów drożdży. (V) Identyfikacja gatunkowa pozyskanych izolatów drożdży w oparciu o przeprowadzone analizy biochemiczne, mikroskopowe i molekularne. (VI) Klasyfikacja pozyskanych izolatów drożdży do poziomów biobezpieczeństwa i określenie ich potencjału chorobotwórczego dla użytkowników plaż i boisk do siatkówki plażowej.

Materiały i metody oraz wyniki są zaprezentowane w sposób przejrzysty. W części metodycznej oraz w dalszych częściach rozprawy pojawia się sformułowanie, iż **próby były pobierane w sezonach letnich 2018-2019 oraz 2019-2020 (np. w Streszczeniu, str. 3). W mojej opinii, sezon letni powinien być opisany jako 2018, 2019 i 2020. Z kolei na str. 30 Autor podaje, że próby były pobierane w okresach „... (od kwietnia do października 2019 i 2020 roku)”. Czy próby były pobierane także w 2018 roku? Przedstawiony przez Autora opis jest niejasny i w związku z tym proszę o wyjaśnienie tych rozbieżności.**

Ponadto w części materiały pojawia się informacja dotycząca składu podłoża do oceny cech morfologicznych drożdży - na stronie 44 w składzie podłoża Autor wskazuje, że źródłem węgla jest „skrobia ziemniaczana lub glukoza 20,0g/10,0 g”. **Czym uzasadniona jest zmiana źródła węgla? Proszę o wyjaśnienie.**

Również na stronie 44, w części Materiały i metody w p. 2.5., znajduje się opis metody badania zdolności fermentacyjnych drożdży. Nie znalazłam jednak w dysertacji wyników tych badań biochemicznych. **Proszę o wyjaśnienie.**

Podczas realizacji zadań badawczych Doktorant pozyskał łącznie aż 298 izolatów drożdży, wśród których zidentyfikował 67 gatunków w większości zaklasyfikowanych do drożdży workowych. Przynależność gatunkowa izolatów została zidentyfikowana dzięki sekwencjonowaniu fragmentów ITS-1 i ITS-4 DNA. W przypadku kilku szczepów % identyfikacji jest niski (np. szczep nr. 15, Tabela 9) i należałoby skorzystać z innych, poza morfologicznymi, metod identyfikacji drożdży. **Proszę o komentarz.**

Wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej są przedstawione wieloaspektowo i bardzo dokładnie przeanalizowane i opisane, co jest niewątpliwym

atutem recenzowanej pracy. Równie wysoko oceniam rozdział Dyskusja, w której Autor w dojrzały sposób komentuje uzyskane przez siebie wyniki porównując je do nielicznych w danym temacie danych literaturowych i omawia potencjalne znaczenie praktyczne uzyskanych wyników. W Dyskusji jest także aspekt, który wymaga szerszego omówienia. Na str. 153 mgr Bałabiński twierdzi, że „...synergiczne stosowanie klasycznych i molekularnych metod identyfikacji drożdży zwiększa skuteczność oznaczeń i powinno stanowić „złoty standard” w laboratoriach mikologicznych”. Obecnie są dostępne liczne techniki biologii molekularnej, które mogą być pomocne w tego typu identyfikacjach. **Proszę o komentarz.**

Przeprowadzone przez Doktoranta eksperymenty oraz uzyskane wyniki poszerzają wiedzę naukową dotyczącą zróżnicowania grzybów mikroskopowych w słabo opisanych siedliskach jakimi są plaże piaszczyste zlokalizowane nad jeziorami. Wyniki oraz dyskusja opisane w dysertacji potwierdzają praktyczną i teoretyczną wiedzę Doktoranta na temat przedstawionego problemu badawczego.

Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej i ich znaczenie

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pana mgr Bałabińskiego zaliczam:

1. Przeprowadzenie analiz składu gatunkowego i liczbowego mykobioty, z uwzględnieniem zmian tej populacji w przestrzeni czasu oraz z uwzględnieniem kontekstów ekologicznych i epidemiologicznych.
2. Uzyskanie nowatorskich danych mykologicznych z piasku pochodzącego z boisk do siatkówki plażowej.
3. Wykazanie obecności gatunków potencjalnie patogennych dla człowieka, w tym gatunków zakwalifikowanych do drugiego poziomu biobezpieczeństwa (BSL-2), w piasku z boisk oraz plaż zlokalizowanych przy kąpieliskach.
4. Udokumentowanie kosmopolitycznego występowania gatunków zaklasyfikowanych do BSL-2 takich jak *Candida glabrata*, *Cutaneotrichosporon jirovecii* i *Cutaneotrichosporon moniliiforme* względem badanych nisz ekologicznych.
5. Potwierdzenie wpływu temperatury na liczebność konsorcjów drożdży w badanych próbach piasku.

6. Potwierdzenie, że synergiczne stosowanie klasycznych i molekularnych metod laboratoryjnych zwiększa prawdopodobieństwo skutecznej identyfikacji gatunkowej drożdży.

Otrzymane w dysertacji wyniki są niezwykle istotne i wskazują na konieczność prowadzenia monitoringu mykologicznego piasku plaż i boisk do siatkówki plażowej oraz stosowania działań prewencyjnych, prowadzących do ograniczenia zagrożenia związanego z obecnością drożdży potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka w tych siedliskach.

Podsumowując, dysertacja mgr Tomasza Bałabańskiego stanowi zbiór interesujących wyników dotyczących występowania drożdży chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych dla ludzi w piasku pochodzącym z plaż i boisk użytkowanych rekreacyjnie, co jest ważnym i aktualnym problemem naukowym. Zaplanowane w trakcie realizacji pracy doktorskiej eksperymenty Doktorant przeprowadził przy użyciu zróżnicowanych technik, które pozwoliły na uzyskanie istotnych i cennych wyników.

Konkluzja końcowa

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Tomasza Bałabańskiego przedstawia szeroko zakrojone i bardzo dobrze zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej wysoki poziom merytoryczny. Moje uwagi i komentarze do przedstawionej mi do oceny rozprawy nie wpływają na ogólną wysoką ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 ze zm.). Wnioskuje do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr Tomasza Bałabańskiego dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie, że względu na wysoki poziom merytoryczny, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej.



Dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ