

Dr hab. n. wet. Marek Gehrke, prof. UMK  
Katedra Diagnostyki i Nauk Klinicznych  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Ul. J. Gagarina 7  
87-100 Toruń

Toruń, dn. 10.11.2023

---

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Kingi Zaręby-Marchewki pt.: „Analiza struktury genomów bakterii z rodzaju *Chlamydia*” – wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Krzysztofa Niemczuka oraz dr Małgorzaty Mazur w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Recenzję wykonano przyjmując zlecenie, którym jest pismo Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 6.10.2023 roku sygnowane numerem BRN-4200/14/23 zgodnie z uchwałą Rady Naukowej ww. Instytutu z dnia 17.12.2018.

Dokonujący się w ostatnich latach szybki rozwój technik biologii molekularnej, w tym zastosowania sekwencjonowania nowej generacji (NGS) zwanego inaczej sekwencjonowaniem przepustowym (HTS), doprowadziło do wzrostu liczby badań nad *Chlamydia spp.* Ich efektem są m.in. raporty o nowych taksonach u ptaków, zarówno u gatunków hodowlanych, jak i wolnożyjących oraz gadów. Wytyczne Podkomitetu ds. Taksonomii Chlamydiae Międzynarodowego Komitetu Systematyki Prokariontów (ICSP) podkreślają brak możliwości wprowadzenia do taksonomii nowego gatunku, chociażby bez wyizolowania szczepu i określenia jego cech fenotypowych, co powoduje, że niektóre szczepy reprezentujące nowe gatunki z rodzaju *Chlamydia* mają status *Candidatus*. Klasyfikacja nowych szczepów jest możliwa na podstawie analizy sekwencji wybranych genów. Tak więc z każdym rokiem rośnie liczba taksonów bakteryjnych opisywanych wyłącznie na podstawie sekwencji genomu. Nie spełnia to obecnie obowiązujących standardów ICSP o ustanowieniu nowych gatunków, gdy nie zostały one wyizolowane w warunkach laboratoryjnych, mogą służyć, jako materiał odniesienia. Od kilku lat toczy się więc dyskusja nad opracowaniem alternatywnego kodu nomenklatury prokariontów trudnych w hodowli, takich jak np. *Chlamydie*.

W przedstawioną problematykę wpisuje się praca doktorska mgr inż. Kingi Zaręby-Marchewki pt.: „Analiza struktury genomów bakterii z rodzaju *Chlamydia*” – wykonana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Krzysztofa Niemczuka oraz dr Małgorzaty Mazur w

Zakładzie Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Praca stanowi 91 stronicowe opracowanie wyników badań. Opracowanie zostało przygotowane według klasycznego sposobu opisu badań, obejmującego liczący jedną stronę spis treści, jednostronicowy wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską wraz z ich punktacją wg. Ministerstwa Edukacji i Nauki i współczynnikami wpływu (IF) wg. Journal Citation Reports, wykaz stosowanych skrótów (2 str.), wstęp (31 str.), cel, zakres i uzasadnienie badań (1 str.), opis wykorzystanych materiałów i zastosowanych metod badawczych (10 str.), podsumowanie opisanych wyników badań (3 str.), wnioski (1 str.), streszczenie w języku polskim i angielskim (5 str.), piśmiennictwo (30 str.) oraz publikacje stanowiące rozprawę doktorską (81 str.). Rozdziały „Wstęp” oraz „Materiał i metody” dodatkowo zostały podzielone na logiczne podrozdziały umożliwiające szybkie odnalezienie opisywanych w pracy zagadnień.

W rozdziale „Wstęp” została przedstawiona charakterystyka i systematyka bakterii z rodzaju *Chlamydia*, cykl rozwojowy, fakty na temat organizacji genomu oraz informacje o występowaniu i patogenezie zakażeń *Chlamydia spp.* u ludzi i zwierząt.

W świetle przytoczonego we wstępie obszernego przeglądu piśmiennictwa doktorantka wskazuje, że celem podjętych przez nią badań było zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji i analizy porównawczej sekwencji genomowych:

- do potwierdzenia występowania atypowych szczepów należących do rodziny *Chlamydiaceae* u ptaków wolnożyjących w Polsce, wykazujących cechy pośrednie pomiędzy *C. psittaci* a *C. abortus* i określenie ich pozycji taksonomicznej,

- a także wobec wykluczenia hipotezy o dominacji u ptaków hodowlanych gatunku *C. psittaci* na korzyść *C. gallinacea* i ograniczonej liczby opisanych genomów tej ostatniej, uzupełnienie baz danych o strukturę genomów szczepów *C. gallinacea* izolowanych w Polsce.

Realizacja badań obejmowała sześć szczegółowo opisanych zadań, które można uznać za konsekwentne, ambitne, a temat badawczy za bardzo istotny.

W rozdziale „Materiał i metody” znajduje się charakterystyka próbek wykorzystanych do badań ze wskazaniem rodzaju próbki, gatunku, od którego była izolowana oraz roku i regionu kraju, opis metod izolacji i namnażania szczepów *Chlamydia spp.*, opis metod ekstrakcji DNA, sposób ilościowej i jakościowej oceny materiału genetycznego, opis metody wysokoprzepustowego sekwencjonowania oraz sposób wstępnej odróbki danych wraz ze wskazaniem dostępu do sekwencji genomowych i surowych danych uzyskanych w badaniach.

Opis metod badań molekularnych i metod statystycznego opracowania wyników wskazują na bardzo dobre opanowanie umiejętności „warsztatowych” doktorantki, tak niezbędnych w realizacji tego typu badań.

W rozdziale „Podsumowanie uzyskanych wyników badań” znajdujemy zwarty opis i podsumowanie efektów badań ze wskazaniem publikacji oryginalnych, do których doktorantka odsyła, jako źródła szczegółowego opisu wyników badań i dyskusji. W „Pracy II.1 i II.2” przedstawiono po raz pierwszy sekwencje genomowe trzech szczepów avian *C. abortus* reprezentujących genotypy G1, G2 i 1V, wyizolowanych z próbek uzyskanych od ptaków wolno żyjących tj. cyraneczki zwyczajnej, kaczki krzyżówki oraz sroki zwyczajnej. W pracy „II.3” zaprezentowano pełne sekwencje genomowe wcześniej wskazanych szczepów oraz wyniki badań porównawczych, których celem było ustalenie ich ostatecznej pozycji filogenetycznej. Dowiedziono, że szczepy avian *C. abortus* powinny być włączone do *C. abortus* izolowanych od ssaków, tym samym wskazując, że obecnie funkcjonująca definicja taksonomiczna jest nieaktualna. W pracy „II.4” opisano wyniki analizy porównawczej sekwencji genomowych jedenastu nowych terenowych szczepów *C. gallinacea* pochodzących z różnych regionów Polski. Potwierdzono, że szczepy *C. gallinacea* są blisko spokrewnione, wykazując ponad 99% podobieństwo nukleotydowe, sugerujące konserwatywną strukturę ich genomu. Dowiedziono jednak, że niektóre loci tj. geny *ompA* i geny kodujące białka metabolizmu podstawowego wykazują duże zróżnicowanie genetyczne. Na tej podstawie stwierdzono, że ich zróżnicowanie jest wystarczające, aby umożliwić genotypowanie i monitoring epidemiologiczny. W badaniach potwierdzono, że polskie szczepy *C. gallinacea* posiadają geny zaangażowane w patogenezę zakażeń. Ich realny udział w procesie patogenezы, udział w ocenie patogenego potencjału *C. gallinacea* i znaczenie dla przemysłu drobiarskiego oraz zdrowia publicznego wymaga dalszych badań wykraczających poza genomikę porównawczą. Całość rozdziału prezentuje konsekwentnie realizowany „scenariusz” analiz zmierzających do ustalenia odpowiedzi na pytania wynikające z celu badań.

Opisane efekty badań doktorantka podsumowała formułując dziewięć logicznych i czytelnych wniosków wynikających z konsekwentnie realizowanych zadań badawczych i uzyskanych wyników.

Opracowanie kończą zwarte streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz kserokopie publikacji stanowiących rozprawę doktorską.

Występując w roli recenzenta chciałbym uzyskać informacje odnośnie do okoliczności pozyskania próbek materiału biologicznego od ptaków wolno żyjących tj. czy były to ptaki,

które stały się przedmiotem badań wynikających z masowej ich upadkowości w środowisku, jakiegoś programu ochrony ich zdrowia, czy też pochodziły z obszaru stanowiącego rezerwat dla ptactwa i innych gatunków zwierząt (np. ogrodów zoologicznych).

Przedstawione opracowanie wykonanych badań oceniam bardzo wysoko, a kierując się jego niezaprzeczalną wartością merytoryczną i aplikacyjną wnioskuję na właściwym etapie przewodu doktorskiego o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej, doceniając zakres, pracowitość i wnikliwość badań, stopień trudności nakreślonych celów badań, a także wkład pracy w przygotowanie opracowania stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Kingi Zaręby-Marchewki pt.: „Analiza struktury genomów bakterii z rodzaju Chlamydia” wykonana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Krzysztofa Niemczuka oraz dr Małgorzaty Mazur w Zakładzie Chorób Bydła i Owiec Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z 14 marca 2003 roku, ze zmianami w Dz.U. z 2005 roku) oraz § 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. Nr 204, poz. 1200).

W związku z powyższym przedkładam Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wnioski o dopuszczenie mgr inż. Kingi Zaręby-Marchewki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



.....  
Dr hab. n. wet. Marek Gehrke, prof. UMK w Toruniu