

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
**lek. wet. Katarzyny Krasoń**

**„Badanie mikrobiomu i wiromu rodzimych gatunków *Culicoides* spp.”**

Układ redakcyjny ocenianej dysertacji odpowiada wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy ona 152 strony wydruku komputerowego, w tym: streszczenie w języku polskim i angielskim spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i bibliografię. Dokumentacja jest bardzo bogata i obejmuje 11 tabel i 44 ryciny umiejętnie włączonych w tekst pracy.

W doktoracie podjęto nowatorski problem badawczy, którym jest wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) do wykrywania patogenów, których wektorami są muchówki z rodziny kuczmanowatych. *Culicoides* mogą przenosić wiele patogenów chorobotwórczych dla zwierząt, przykładem których mogą być np., wirus choroby niebieskiego języka, czy wirus afrykańskiego pomoru koni, a także dla ludzi (wirus Oropouch). Ponadto samo ich żerowanie na zwierzętach (a także ludziach) może być przyczyną dyskomfortu, stresu oraz miejscowych reakcji zapalnych i alergicznych. Stawonogi te potrafią przemieszczać się na znaczne odległości, co powoduje, że odgrywają one istotną rolę w szerzeniu się chorób zakaźnych i inwazyjnych, spośród których część stanowi istotny problem ekonomiczny. Wszystko to sprawia, że istnieje konieczność prowadzenia dokładnego monitoringu zarówno szerzenia się samych kuczmanów na obszarze Polski, jak i czynników chorobotwórczych, które mogą być przez nie przenoszone.

Lek wet. Katarzyna Krasoń zastosowała w swoich badaniach sekwencjonowanie nowej generacji w celu identyfikacji patogenów przenoszonych przez rodzime gatunki *Culicoides*, co pozwoliło na lepsze poznanie mikroflory tych stawonogów. Tego typu badania są istotne, gdyż umożliwiają prowadzenie stałego nadzoru nad niebezpiecznymi chorobami ludzi i zwierząt, jak i aktualizację ich sytuacji epizootycznej. Niewielka ilość podobnych, tak kompleksowych, jak przeprowadzone przez Doktorantkę, badań była przyczyną podjęcia

przez Nią tematu badawczego zaprezentowanego w tytule pracy doktorskiej. Decyzję o prowadzeniu obserwacji w tym obszarze podjęła Ona ze świadomością trudności związanych z koniecznością przeprowadzenia pracochłonnych analiz wykonanych na dużej grupie stawonogów oraz analizy licznych danych w oparciu o które możliwe będzie określenie w precyzyjny sposób mikrobiomu/wiromu różnych gatunków *Culicoides* spp. Podjęcie przez lek. wet. Katarzynę Krasoń badań dotyczących zagadnień zaprezentowanych w tytule pracy należy uznać za trafne i w pełni uzasadnione zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym.

Pracę rozpoczyna, poprzedzony streszczeniem, i spisem treści dwudziestoosiemiostronicowy wstęp prezentujący: ogólną charakterystykę *Culicoides* spp., ich zasięg geograficznego występowania, taksonomię, morfologię, biologię, ich potencjalnych żywicieli, kompetencję i pojemność wektorową oraz sposoby transmisji różnych patogenów. Doktorantka wprowadziła także czytelników w zagadnienia metagenomiki, prezentując czym jest genom, wirom oraz przedstawiając istotę badań metagenomicznych.

Ta część pracy jest bardzo obszerna i mogłaby być skrócona np. poprzez skrócenie podrozdziałów poświęconych taksonomii, biologii, czy morfologii stawonogów.

Pierwsza część dysertacji wskazuje na bardzo dobrą znajomość przez Doktorantkę badanej tematyki i piśmiennictwa. Jest ona tak napisana, że uzasadnia celowość prowadzenia badań podjętych przez lek. wet. Katarzynę Krasoń i pozwala na sformułowanie ich ostatecznego celu, który logicznie wypływa z przedstawionego we wstępie opisu.

Doktorantka postawiła sobie do realizacji trzy cele badawcze tj.: opracowanie i optymalizacja metod wykrywania wirusów, bakterii, archeonów, grzybów i pierwotniaków u *Culicoides* spp.; identyfikację wirusów, które mogą być przenoszone przez kuczmany; określenie roli *Culicoides* w transmisji wirusów.

W Rozdziale „Materiały i Metody”, liczącym 19 stron, Autorka opisała użyte w pracy materiały oraz metodyki badawcze. Do badań wykorzystwała próbki, przygotowane w ramach trzech projektów dotyczących monitoringu zakażenia wirusem Schmallenberg w Polsce. Owady pulowano w zależności od gatunku i postaci gonotroficznej (nulliparous, blood-fed, parous i gravid). Dodatkowo wykorzystano pule składające się z samców kuczmanów. Mirobiom i wirom analizowano w oparciu o dwa podejścia NGS: metataksonomikę genu 16S i metagenomikę.

Materiał i metodyka badań zostały dobrane poprawnie i bardzo precyzyjnie opisane (zarówno pochodzenie próbek do analiz, technika ekstrakcji DNA i RNA, ultrawierowienia,

przygotowanie bibliotek, i ich walidacja). Lakonicznie opisano jedynie sekwencjonowanie, co powinno zostać uzupełnione w tekście.

Wyniki badań przedstawiono na 44 stronach, pracy, w które umiejętnie wkomponowano ryciny i tabele prezentujące uzyskane przez Doktorantkę rezultaty.

Analiza metataksonomiczna bakteryjnego genu 16SRNA wykazała, że najczęściej identyfikowanymi drobnoustrojami w organizmach przebadanych kuczmanów były: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i *Aeromonas*. Największą różnorodność bakteryjnego DNA wykazano w organizmie *Culicoides obsoletus/scoticus* complex, z reguły nie zaobserwowano różnic w składzie gatunkowym bakterii pomiędzy różnymi formami gonotroficznych stawonogów, natomiast osobniki żeńskie charakteryzowały się większą różnorodnością wykrytego DNA bakteryjnego niż męskie. Sekwencjonowanie NGS w pulach zawierających różne gatunki *Culicoides* wykazało obecność w nich różnorodnego mikrobiomu, zwłaszcza *Proteobactertria*, *Firmicutes* i *Bacterioidetes*.

Ta część pracy, choć starannie przygotowana, powinna w mojej ocenie zostać przerezegowana. Doktorantka podzieliła wyniki na wiele podrozdziałów powielając w nich w wielu miejscach te same informacje (np. w podrozdziałach 4.2.1.1.1 i 4.2.1.2.1). Są one rozproszone w wielu miejscach. Powinny zostać zebrane w jeden rozdział i wystarczyłoby podsumować całość jednym zdaniem, odnośnie tego, które bakterie (a raczej ich materiał genetyczny), są najczęściej wykrywane u jakich gatunków kuczmanów, w jakich formach gonotroficznych i u przedstawicieli której płci.

Ta sama uwaga odnosi się do wiromu, analiz składu protista i archeonów. Lek. wet. Katarzyna Krasoń przedstawiła występowanie materiału genetycznego tych patogenów w organizmie *Culicoides* z „różnych punktów widzenia”, co nie zmienia faktu, że gatunkiem stawonogów, w organizmie których najczęściej je wykrywano był *Culicoides obsoletus/scoticus* complex, a największą różnorodnością ich DNA/RNA charakteryzowała się forma blood-fed. W odniesieniu do wirusów, podobnie jak w przypadku bakterii, osobniki żeńskie cechowały się większą różnorodnością wykrytego materiału genetycznego niż męskie, a u badanych osobników najczęściej wykrywano materiał genetyczny lentiwirusów, mimiwirusów i eneterowirusów.

Analiza metagenomiczna przeprowadzona w kierunku detekcji materiału genetycznego grzybów, protista i archeonów wykazała, że w organizmie stawonogów najczęściej stwierdzano DNA grzybów *Aspergillus*, *Candida* i *Fusarium*, protista: *Plasmopodium*, *Tatraymana*, *Trypanosoma* oraz archeonów: *Metanosarcina*, *Termococcus*, *Methanobacterium*. Także ta część doktoratu potwierdza już obserwowaną wcześniej

prawidłowość odnośnie tego, że samice kuczmanów oraz formę gonotroficzną blood-fed cechuje największa różnorodność DNA grzybów i organizmów zaliczanych do królestwa *Protista* i archeonów.

Na końcu rozdziału „Wyniki” Doktorantka raz jeszcze przedstawiła zestawienie uzyskanych rezultatów badań metagenomicznych. Jest to moim zdaniem zabieg niepotrzebny, który powiela już wcześniej opisane wyniki analiz.

W liczącym 20 stron rozdziale „Dyskusja” Doktorantka podkreśliła, iż zaprezentowane w pracy badania są jednymi z nielicznych pozwalających na prześledzenie mikrobiomu/wiromu u *Culicoides*, a ich wyniki wykazały iż są one bogate i złożone u tych stawonogów. Jednocześnie udowodniła, że NGS jest przydatnym narzędziem do prowadzenia tego typu analiz, a jego wykorzystanie w badaniach przedstawionych w pracy pozwoliło wykryć w organizmach kuczmanów patogeny istotne dla zwierząt udomowionych, jak i dzikich oraz ludzi

Lek. wet. Katarzyna Krasoń potwierdziła, iż bardzo sprawnie porusza się w temacie szeroko pojętej metagenomiki i jej wykorzystaniu w identyfikacji czynników zakaźnych i inwazyjnych. Doktorantka właściwie interpretuje wyniki badań własnych i konfrontuje je umiejętnie z obserwacjami innych autorów. Wskazała, co może być przyczyną rozbieżności w składzie mikrobiomu u: poszczególnych gatunków *Culicoides* spp, ich form gonotroficznych oraz samców i samic. Zasugerowała także w którym kierunku powinny zmierzać dalsze badania aby móc potwierdzić z całą pewnością kompetencje kuczmanów jako wektorów wykrytych w ich organizmie patogenów.

Praca zakończona jest aż dziewięcioma wnioskami. Pierwsze sześć nie są faktycznymi wnioskami, a jedynie stwierdzeniami jakie analizy zostały wykonane w ramach doktoratu. Wnioski powinny prezentować efekty przeprowadzonych badań, które mają wpływ na rozwój w tym przypadku nauk weterynaryjnych. Właściwe wnioski to w moim odczuciu te przedstawione w punkcie g-i, pozostałe sugerowałby usunąć z tekstu doktoratu

Wykaz piśmiennictwa jest bogaty i świadczy o zdolności doboru właściwych materiałów źródłowych do analizy wyników i dyskusji w ramach tematyki będącej przedmiotem badań.

Reasumując stwierdzam, że przedstawione w pracy zagadnienia stanowią ważne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej mikrobiomu i wiromu rodzimych gatunków *Culicoides* spp.

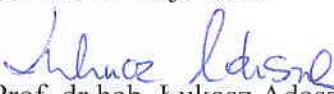
Praca zawiera elementy nowatorskie, została wykonana metodycznie poprawnie. Doktorantka włożyła wiele wysiłku w przeprowadzenie badań i analizę uzyskanych wyników.

Rezultaty badań mają duże znaczenie poznawcze zarówno dla lekarzy weterynarii biologów, jak i lekarzy medycyny człowieka.

Nieznaczące uwagi krytyczne przedstawione w treści recenzji pracy mają w większości charakter porządkowy i nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy. Doktorantka włożyła wiele pracy w wykonanie dość trudnych badań, wywiązując się w pełni z zadań określonych w celach badawczych.

W konkluzji stwierdzam, że praca doktorska pt.: **"Badanie mikrobiomu i wiromu rodzimych gatunków *Culicoides* spp."** odpowiada warunkom określonym Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 571 z późn. zm.), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej PIW-et-PIB w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Katarzyny Krasoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej stosowaną nagrodą.

Lublin, 29 maja 2025

  
Prof. dr hab. Łukasz Adaszek,