

Dr hab. inż. Adam Roman, prof. uczelni

Wrocław, dnia 5.08.2021 r.

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

ul. Chelmońskiego 38C, 51-630 Wrocław

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Katarzyny Buczek

**pt. „Aktywność związków porfiryńowych wobec mikrosporydiów *Nosema ceranae*
powodujących nosemozę pszczół miodnych”**

Podstawę opracowania recenzji stanowi decyzja Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie oraz pismo z dnia 17.06.2021 r. dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych UMCS w Lublinie pani prof. dr hab. Anny Jarosz-Wilkolazkiej.

1. Syntetyczna charakterystyka recenzowanej rozprawy

Promotorem rozprawy doktorskiej jest dr hab. Mariusz Trytek, prof. UMCS

Przedmiotowa rozprawa doktorska dotyczy problematyki oceny aktywności związków porfiryńowych wobec mikrosporydiów *Nosema ceranae*, które wywołują nosemozę pszczoły miodnej. Analizy dokonano w kilku etapach. Najpierw zostały wyselekcjonowane najbardziej efektywne związki porfiryńowe oraz oceniono wpływ naświetlania na ich aktywność przeciw sporom *N. ceranae*. Następnie wykazano zależności pomiędzy rodzajem podstawnika w pierścieniu porfiryńowym, a aktywnością antymikrosporydialną porfiryń *in vitro*. Określono optymalne stężenie dla aktywności związków porfiryńowych oraz potencjał wnikania porfiryń do wnętrza spor. W dalszym etapie określono wpływ porfiryń na zdolność infekcyjną zarodników i rozwój w organizmach pszczół. W końcowym etapie zbadano czy wyselekcjonowane związki porfiryńowe wykazują aktywność antymikrosporydialną *in vivo*, czy nie działają szkodliwie na robotnice pszczoły miodnej oraz jaki jest wpływ porfiryń na przeżywalność pszczół zdrowych i zainfekowanych sporami *N. ceranae*.

Całokształt pracy ma spójną strukturę i składa się z: 6 zasadniczych i ponumerowanych rozdziałów, z których jeden (rozdział 3) rozbudowany został o 8 podrozdziałów. Całość została uzupełniona streszczeniami w języku polskim i angielskim, życiorysem naukowym autorki, trzema publikacjami wchodzącymi w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej, suplementami do metodyki zastosowanej w publikacjach oraz oświadczeniami współautorów tych publikacji. Pracę wzbogacono 2 rycinami zawartymi w tekście (oprócz tych, zamieszczonych w publikacjach). W spisie bibliograficznym zawartym w rozprawie znajduje się 56 pozycji literaturowych i opracowań, w tym: 49 pozycji autorów zagranicznych oraz 7 pozycji autorów polskich.

Całość pracy zawarta jest na 92 ponumerowanych stronach z tym, że na stronach od 32 do 36 znajduje się życiorys naukowy Doktorantki, na stronach od 38 do 65 zamieszczone są 2 prace wchodzące w skład rozprawy, na stronach 66 do 76 znajdują się suplementy do tych prac. Z kolei na stronach 77 do 89 zamieszczona jest trzecia publikacja wchodząca w skład dysertacji.

a na stronach 90-92 umieszczony jest suplement do materiału. Dodatkowo na stronach 93 do 111 znajdują się oświadczenia współautorów prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi trzy oryginalne prace naukowe:

1. Ptasińska Aneta A., Trytek Mariusz, Borsuk Grzegorz, **Buczek Katarzyna**, Rybicka-Jasińska Katarzyna, Gryko Dorota (2018). Porphyrins inactivate *Nosema* spp. microsporidia. Sci. Rep., 8, 5523, doi: 10.1038/s41598-018-23678-8

Impact Factor₂₀₁₈: **4,011**

Punkty MNiSW₂₀₁₈: **40** (według starej punktacji czasopism)

2. **Buczek Katarzyna**, Trytek Mariusz, Deryło Kamil, Borsuk Grzegorz, Rybicka-Jasińska Katarzyna, Gryko Dorota, Cytryńska Małgorzata, Tchórzewski Marek (2020). Bioactivity studies of porphyrinoids against microsporidia isolated from honeybees. Sci. Rep., 10, 11553, doi: 10.1038/s41598-020-68420-5

Impact Factor₂₀₁₉: **3,998**

Punkty MNiSW₂₀₂₀: **140**

3. **Buczek Katarzyna**, Deryło Kamil, Kutyla Mateusz, Rybicka-Jasińska Katarzyna, Gryko Dorota, Borsuk Grzegorz, Rodzik Beata, Trytek Mariusz (2020). Impact of protoporphyrin lysine derivatives on the ability of *Nosema ceranae* spores to infect honeybees. Insects, 11(8): 504, doi: 10.3390/insects11080504

Impact Factor₂₀₁₉: **2,220**

Punkty MNiSW₂₀₂₀: **100**

Łączna punktacja MNiSW prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej to 280 pkt., a IF = 10,229.

W pierwszej publikacji Doktorantka jest czwartą autorką, co wskazuje na początkowe rozpoznanie przez nią tematyki, natomiast w dwóch kolejnych jest pierwszą autorką, co świadczy o jej znaczącej roli w zespole zajmującym się tym tematem badawczym.

2. Ocena doboru tematu rozprawy

W mojej ocenie temat rozprawy doktorskiej jest bardzo ciekawy i aktualny, gdyż nosemoza pszczoły miodnej (zwłaszcza wywołwana przez wewnątrzkomórkowego pasożyta *Nosema ceranae*) stała się jedną z przyczyn nadmiernej śmiertelności pszczół robotnic oraz całych rodzin pszczelich. Pasożyt ten w Polsce po raz pierwszy został stwierdzony u pszczoły miodnej w 2006 r. Jednak podejrzewano, że już wcześniej występował w rodzinach pszczelich, co potwierdziły badania próbek pszczół zebranych w 1995 r. [Topolska i Gajda 2009]. Obecnie jest bardziej rozpowszechniony w Europie niż *Nosema apis*, który jest pasożytem endemicznym dla pszczoły miodnej na tym obszarze. Badania wykazały, że *Nosema ceranae* jest bardziej patogenny dla pszczoły miodnej niż *Nosema apis* [Higes i wsp. 2008]. Ma znacznie krótszy cykl rozwojowy, który trwa 3 dni (u *N. apis* jest to 5 dni), a do rozwoju choroby wystarczy jednorazowa dawka spor i jedna zarażona komórka nabłonka jelita środkowego. Z jednej zarażonej komórki nabłonka jelita już po 3 dniach inwazja może rozprzestrzenić się na wszystkie pozostałe komórki nabłonka [Meana 2009]. Istotą tego pasożyta jest to, że namnażanie zachodzi nie tylko w komórkach nabłonka palisadowego, ale także w komórkach krypt regeneracyjnych, co uniemożliwia regenerację nabłonka [Kasprzak i Topolska 2007]. Rozwijająca się w organizmie pszczoły choroba prowadzi do głodu, zwiększa stres energetyczny i skraca długość życia pszczół (giną już w 8 dniu od zarażenia). Istotą tej choroby jest to, że jej oznaki nie są widoczne dopóty, dopóki matka jest w stanie intensywnie czerwić i

dzięki temu wyrównać ubytki pszczół chorych. Jednak po okresie braku objawów choroby, następuje gwałtowny spadek liczebności pszczół w rodzinie. Pszczoły chore giną poza ulem, co najprawdopodobniej jest wynikiem tego, że mają gorszą pamięć, a w wyniku odczuwania głodu podejmują większe ryzyko w poszukiwaniu pokarmu [Naug 2009].

Zwalczanie choroby w rodzinach pszczelich jest trudne i często nie daje oczekiwanych efektów. Od kiedy w Europie obowiązuje całkowity zakaz stosowania fumagiliny (brak ustalonych wartości MRL dla pozostałości fumagiliny w produktach pszczelich), która redukowałą liczbę spor w pszczołach nawet o 70%, nie ma skutecznego leku na tę chorobę. Dlatego prowadzone są liczne badania mające na celu opracowanie skutecznej metody leczenia nosemozy. Najczęściej próbuje się wykorzystywać w tym celu ekstrakty lub wyciągi z różnych roślin, ale ich efekty profilaktyczne lub lecznicze są niezadowalające. Dlatego metody zwalczania zarażenia sporami *Nosema ceranae*, głównie opierają się na zabiegach higieniczno-profilaktyczno-hodowlanych.

W związku z tym, bardzo wysoko oceniam dobór tematu rozprawy doktorskiej, w której Doktorantka opisała próby wykorzystania związków porfiryńowych do inaktywacji mikrosporydiów *Nosema ceranae* u pszczoły miodnej.

Porfiryny są związkami biologicznie czynnymi heterocyklicznymi składającymi się z czterech pierścieni pirolowych połączonych mostkami metinowymi. Połączone poprzez mostki pierścienie pirolowe tworzą układ sprzężonych wiązań podwójnych zawierających 18 zdelokalizowanych elektronów π , spełniający regułę aromatyczności Hückle'a.

Związki, w których występują porfiryny, czyli chlorofil, hem, cytochromy, peroksydazy, kobalaminy czy też koenzymy korynowe odgrywają ogromną rolę w środowisku naturalnym i życiu organizmów. Są odpowiedzialne za procesy fotosyntezy, transportu i magazynowania tlenu, fermentacji, transferu elektronów oraz funkcje regulacji i sterowania metabolizmem. Porfiryny są bardzo reaktywne i ulegają wielu typom przemian chemicznych takim, jak: reakcje utleniania i redukcji, polimeryzacji czy agregacji. Biorą czynny udział w procesach katalizy, sorpcji oraz w przemianach fotochemicznych. Dzięki specyficznym właściwościom spektroskopowym, magnetycznym, luminescencyjnym oraz zdolności do fotoprzewodnictwa i fotoemisji, porfiryny stały się niezbędnym elementem w procesie ewolucji organizmów żywych. W przyrodzie spełniają różne funkcje, m. in. transport i magazynowanie O_2 (hemoglobina/mioglobina), metaboliczne utlenianie substancji organicznych (peroksydazy i cytochrom P_{450}), transfer elektronów (cytochromy b i c) czy redukcja O_2 do wody (cytochrom a) [Trytek i wsp. 2005]. Do tej pory badania nad porfirydami były skoncentrowane na ich wykorzystaniu w medycynie ludzkiej, zwłaszcza do niszczenia komórek nowotworowych w tzw. terapii fotodynamicznej PDT oraz mikroorganizmów patogennych dla człowieka (np. infekcji bakteryjnych). Z kolei metaloporfiryny wykorzystywane są jako kontrast w rezonansie magnetycznym.

Wykorzystanie porfiryń do zwalczania drobnoustrojów chorobotwórczych u pszczoły miodnej jest nowatorskim kierunkiem badań.

3. Ogólna charakterystyka rozprawy

Treść rozprawy doktorskiej została przedstawiona w sześciu zasadniczych i ponumerowanych rozdziałach, które zostały poprzedzone spisem treści oraz wykazem (z opisem) skrótów używanych w dysertacji.

We wstępie – **rozdział pierwszy**, Autorka rozprawy przedstawiła tło i genezę poruszanych zagadnień. Opisała w nim zagrożenia, na jakie obecnie narażone są zapylacze, w tym także pszczoła miodna. Za szczególnie istotne czynniki zagrażające pszczołom uznała fragmentację siedlisk, w

których żyją i żerują pszczoły, zmiany klimatyczne, pojawienie się gatunków inwazyjnych oraz nowych pasożytów i patogenów chorobotwórczych, a także zwiększenie stosowania pestycydów w rolnictwie. Wszystkie te czynniki składają się na zjawisko określane jako „zespół masowego ginięcia pszczoły miodnej” (CCD – Colony Collapse Disorder). Następnie opisała dwa gatunki sporowców, *Nosema apis* i *Nosema ceranae*, grzyby należące do typu mikrosporydiów, które wywołują groźną dla dorosłych pszczół miodnych chorobę nazwaną nosemozą. Doktorantka opisała budowę zarodników badanych mikrosporydiów, sposoby ich przenikania do organizmu pszczoły oraz inwazji do komórek nabłonka jelita środkowego. Przedstawiła też skutki rozwoju mikrosporydiów w komórkach nabłonka jelita jako zwiększenie stresu energetycznego u pszczół („głodu” na poziomie komórkowym) oraz skrócenia ich życia. Autorka zaprezentowała też dotychczasowe sposoby walki z nosemozą oraz próby poszukiwania nowych substancji, które byłyby skuteczne w inaktywacji spor *Nosema*. Nawiązała także do tematyki swojej pracy i zaanonsowała możliwości wykorzystania związków porfiryńowych do zwalczania nosemozy.

W **rozdziale drugim** Autorka przedstawiła 6 celów szczegółowych pracy:

1. Wyselekcjonowanie najbardziej efektywnych związków porfiryńowych i określenie wpływu naświetlania na ich aktywność przeciw zarodnikom *N. ceranae*.
2. Ocena zależności pomiędzy rodzajem podstawnika w pierścieniu porfiryńowym, a aktywnością antymikrosporydialną porfiryń *in vitro*.
3. Określenie optymalnego stężenia dla aktywności związków porfiryńowych.
4. Określenie potencjału wnikania porfiryń do wnętrza zarodników.
5. Wpływ porfiryń na zdolność infekcyjną zarodników i rozwój w organizmach pszczół.
6. Zbadanie czy wyselekcjonowane związki porfiryńowe wykazują aktywność antymikrosporydialną *in vivo* i nie działają szkodliwie na pszczoły miodne; określenie wpływu porfiryń na przeżywalność pszczół zdrowych i zakażonych zarodnikami *N. ceranae*.

Uważam, że cele te są właściwe, jasno sprecyzowane, a kolejność ich realizacji uzasadniona merytorycznie.

Kolejny, czyli **rozdział trzeci** stanowi omówienie wyników, które zostało podzielone na 8 podrozdziałów.

W podrozdziale nr 3.1. Doktorantka opisała związki porfiryńowe wykorzystane w badaniach, odnosząc się do publikacji nr 2 wchodzącej w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską oraz suplementu do tej publikacji.

W podrozdziale nr 3.2. zawarła informację o pochodzeniu materiału biologicznego (osypów pszczół i żywych pszczół) wykorzystanych do badań – Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

W podrozdziale nr 3.3. Autorka opisała sposób selekcji materiału biologicznego, izolacji zarodników *Nosema* oraz ich identyfikacji gatunkowej techniką PCR. Następnie określiła udział żywych i martwych zarodników *N. ceranae* techniką barwienia fluorescencyjnego, z wykorzystaniem techniki mikroskopowej. Tę część metodyki badawczej również odniosła do publikacji nr 2.

Podrozdział nr 3.4. stanowi opis badań *in vitro* nad antymikrosporydialną aktywnością porfiryń, do których wybrano zarodniki o największej liczbie żywych komórek. We wszystkich próbach zawierających porfiryńy Doktorantka zaobserwowała istotnie niższe liczby zarodników w porównaniu z próbą kontrolną. Opisała, jaki procent redukcji zarodników uzyskiwała przy różnych stężeniach porfiryń (10, 50 i 100 μM) oraz dwóch okresach ich działania na zarodniki (8 i 24 godziny). W tej części doświadczenia oceniła działanie antymikrosporydialne związków porfiryńowych w ciemności. Dodatkowo dla porfiryń w

stężeniu 50 μM , określonym jako optymalne. Autorka wykonała identyczne doświadczenie, ale w warunkach zastosowania naświetlenia światłem widzialnym przez 8 lub 24 godziny. Wykazała, że po 8 godz. naświetlania istotnie zmniejszyła się aktywność porfiryn w stosunku do zarodników *N. ceranae* w porównaniu z działaniem w ciemności. Z kolei po 24 godzinach nieznacznie wyższą aktywność odnotowała jedynie w przypadku trzech porfiryn. Tę część omówienia wyników Doktorantka także odniosła do publikacji nr 2. W części omówienia wyników odnoszącej się do publikacji nr 1, gdzie dokonano analizy zarodników *N. ceranae*, z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej, Autorka wykazała, że w próbach traktowanych porfirynami obecne były liczne fragmenty porozrywanych zarodników oraz komórki o znacznych zmianach morfologicznych w porównaniu z zarodnikami z próby kontrolnej. Następnie metodą mikroskopii konfokalnej wykonała obrazowanie żywych i martwych komórek, w celu określenia przeżywalności zarodników po zastosowaniu związków porfiryńowych (po 24 godzinach). Doktorantka wykazała, że w stosunku do początkowej liczby zarodników po 24-godzinnej inkubacji z pochodną protoporfiryny zawierającą reszty kwasu asparaginowego, pochodną protoporfiryny zawierającą reszty lizyny z przeciwjonem sodowym oraz kompleksem jonów cynku II z pochodną protoporfiryny zawierającą reszty kwasu asparaginowego i pochodną protoporfiryny zawierającą reszty podwójnej lizyny, pozostało jedynie od 1,6 do 4,3% żywych komórek.

W podrozdziale nr 3.5. Doktorantka, w układzie *in vitro*, sprawdziła czy pochodne porfiryn wnikają do wnętrza zarodników, czy też akumulują się wyłącznie w ich ścianie komórkowej. W tej części doświadczenia wykorzystwała stężenia 50 μM dwóch porfiryn: pochodnej protoporfiryny zawierającej reszty lizyny z przeciwjonem trójfluorooctowym i pochodnej protoporfiryny zawierającej reszty podwójnej lizyny. Obrazy rejestrowała w mikroskopie konfokalnym w trybie detekcji sygnału fluorescencji w zakresie światła czerwonego (600-700 nm, pochodzącego od porfiryny) i w trybie obrazowania spektralnego (411-692 nm). W przypadku żywych zarodników inkubowanych z porfirynami przez 4 godziny, Autorka odnotowała 32,4% i 54,4% komórek emitujących czerwoną fluorescencję. Wykazała, że sygnał fluorescencji pochodził z wnętrza zarodnika i nie obserwowano go w obszarze ściany komórkowej zarodników, co świadczy o wnikaniu porfiryn do wnętrza komórek.

W podrozdziale nr 3.6. Autorka opisała wpływ porfiryn na zdolności infekcyjne zarodników *N. ceranae*. W tej części badań doświadczenie wykonała na robotnicach pszczoły miodnej, począwszy od pierwszego dnia ich życia. Na wstępie Doktorantka przedstawiła całą metodykę doświadczenia – przygotowanie zarodników (oczyszczenie i inkubowanie), sporządzenie roztworu infekcyjnego, przygotowanie i sposób zainfekowania pszczoł. Następnie w 7, 12 i 20 dniu po zakażeniu sprawdzała poziom zakażenia poprzez określenie liczby zarodników *N. ceranae* na jedną pszczołę. W porównaniu z pszczołami kontrolnymi, pszczoły zainfekowane zarodnikami inkubowanymi z każdą z porfiryn wykazywały znacznie mniej zarodników po 7 i 12 dniach od zakażenia. Jednocześnie Autorka zaobserwowała istotnie niższą śmiertelność pszczoł zainfekowanych zarodnikami inkubowanymi z wybranymi porfirynami w porównaniu z grupą kontrolną. Tę część omówienia wyników Doktorantka odniosła do publikacji nr 3.

Podrozdział nr 3.7. traktuje na temat oceny aktywności antymikrosporydialnej porfiryn w warunkach *in vivo*, w doświadczeniu klatkowym, z wykorzystaniem 1-dniowych pszczoł robotnic. W grupach pszczoł karmionych roztworami porfiryn Autorka zaobserwowała istotny spadek poziomu zakażenia w stosunku do pszczoł kontrolnych karmionych syropem cukrowym bez dodatku porfiryn. W 10 i 16 dniu doświadczenia Doktorantka wykazała istotnie wyższą aktywność pochodnej protoporfiryny zawierającej reszty podwójnej lizyny w redukcji zarodników względem pochodnej protoporfiryny zawierającej reszty lizyny z przeciwjonem trójfluorooctowym. Natomiast w 18 dniu doświadczenia, liczba zarodników spadła o 69-76%

u pszczoł leczonych porfirynami w stosunku do pszczoł kontrolnych i nie odnotowano w tym dniu istotnych różnic pomiędzy porfirynami. W przypadku pszczoł zdrowych nie odnotowała przypadkowej infekcji w ciągu trwania doświadczenia. Pszczoły zakażone, którym podawała związki porfiryne nie wykazywały istotnie dłuższego życia w stosunku do pszczoł kontrolnych. Ciekawe jest to, że Pani Magister wykazała, iż zakażone pszczoły, którym podawano pochodną protoporfiryny zawierającej reszty lizyny z przeciwjonem trójfluorooctowym żyły tak długo, jak zdrowe pszczoły kontrolne. Warto odnotowania jest też to, że kompleks jonów cynku II z pochodną protoporfiryny zawierającej reszty kwasu asparaginowego spowodował wzrost śmiertelności zdrowych pszczoł o 23%. Tę część omówienia wyników Doktorantka odniosła do publikacji nr 2.

Podrozdział nr 3.8. stanowi analiza statystyczna, a ściślej mówiąc wykaz testów statystycznych, które Autorka wykorzystała w dysertacji do statystycznej analizy wyników badań.

W **rozdziale czwartym** Autorka zaprezentowała dyskusję wyników. Rozdział ten jest jasno i czytelnie skonstruowany, choć nie jest klasyczną konfrontacją wyników uzyskanych w badaniach własnych z wynikami innych autorów. Doktorantka przeanalizowała w nim całość swojej pracy badawczej, potwierdzając kolejne swoje stwierdzenia dostępnymi pozycjami piśmiennictwa. W rozdziale tym, także odnosi się do kolejnych publikacji wchodzących w skład cyklu składającego się na rozprawę doktorską. Rozdziały poświęcone dyskusji wyników w tych publikacjach są dość obszerne i dokładnie konfrontują wyniki własne autorów z wynikami dostępnymi w fachowej literaturze światowej. Dlatego też uważam, że opracowanie tego rozdziału zaprezentowane przez Doktorantkę jest wystarczające, gdyż stanowi swego rodzaju résumé dyskusji z poszczególnych publikacji Jej współautorstwa.

Rozdział piąty stanowi podsumowanie i wnioski, w których Autorka przedstawiła w sposób syntetyczny efekty przeprowadzonych badań w ramach realizacji pracy. Wyniki badań umożliwiły także sformułowanie trzech trafnych wniosków, a mianowicie:

1. Skuteczność porfiryn w zwalczaniu *N. ceranae* zależy od rodzaju aminokwasów przyłączonych do cząsteczki protoporfiryny IX.
2. Przyłączenie drugiej jednostki aminokwasu do cząsteczki PP-IX przyczynia się do obniżenia poziomu zakażenia w większym stopniu niż w przypadku porfiryne zawierającej tylko pojedynczy aminokwas.
3. Związki porfiryne podawane w syropie cukrowym zdrowym pszczołom nie mają negatywnego wpływu na długość ich życia z wyjątkiem zastosowanej metaloporfiryny z cynkiem.

Trzeci wniosek był także inspiracją dla Doktorantki na wskazanie kierunku dalszych prac badawczych, którym będzie ocena toksyczności dla pszczoł metaloporfiryn, które okazały się skuteczne w obniżaniu liczby zarodników *Nosema*, ale zwiększały śmiertelność pszczoł.

4. Ocena merytoryczna rozprawy

Uważam, że merytorycznie rozprawa została napisana właściwie. Publikacje zaliczone do cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej zostały dobrane prawidłowo, są zbieżne tematycznie i stanowią ciąg kolejnych działań badawczych, w których znaczną rolę odgrywała Doktorantka. Do najważniejszych osiągnięć Autorki mogę zaliczyć, to że wykazała wysoką aktywność przeciw *N. ceranae* amidowych pochodnych PP-IX - w testach *in vitro* inkubując zarodniki *N. ceranae* z porfirynami. Potwierdziła bezpośrednie działanie porfiryn na spory *Nosema* oraz ustaliła optymalne stężenia porfiryn do ich zwalczania na niskim poziomie 50 μM , co zwiększa bezpieczeństwo ich praktycznego zastosowania. Udowodniła, że pochodne porfiryn wykazują się niezależną od światła aktywnością przeciw *N. ceranae*. Na podstawie przeprowadzonych testów *in vitro* dokonała wyboru najskuteczniejszych związków

porfiryńowych zmniejszających liczbę zarodników, co dało podstawę do przeprowadzenia testów na żywych pszczołach. Wykazała także, że inaktywowane porfiryńami zarodniki *N. ceranae* wykazują mniejszą zdolność infekcyjną i charakteryzują się ograniczonym rozwojem w jelitach pszczoł. Bardzo ważne, także z punktu widzenia zastosowania praktycznego, jest wykazanie przez Doktorantkę, że porfiryńy mają właściwości lecznicze wobec pszczoł zakażonych *N. ceranae*. Tym bardziej jest to cenne, że Doktorantka nie zaobserwowała wpływu związków porfiryńowych na długość życia zdrowych pszczoł. Konkluzja z rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Buczek jest bardzo ważna, gdyż zaprezentowane wyniki badań dają podstawę do stwierdzenia, że pochodne porfiryń są obiecującymi związkami w walce z nosemozą, co stwarza realną szansę ich zastosowania w praktyce pszczelarskiej.

Uwagi:

W mojej ocenie każdy rozdział w tego typu opracowaniu powinien zostać napisany w formie bezosobowej. W rozdziale „Dyskusja” (str. 19, 21 i 22) Doktorantka w kilku miejscach stosuje formę osobową, którą przeplata z formą bezosobową. Stwierdzenia typu: „W pierwszym etapie moich badań skoncentrowałam się ...”; „Przeanalizowałam je ...”; „Następnie opracowałam ...”; „Wyniki tych prac umożliwiły mi ...”; „Obserwacje wynikające z moich badań ...” w pracy doktorskiej nie powinny mieć miejsca, gdyż powodują one, że praca traci charakter obiektywnego opracowania naukowego.

Rozdział Omówienie wyników tak naprawdę jest zbitką dwóch rozdziałów: Materiał i metody oraz Omówienie wyników. W mojej ocenie, dla większej przejrzystości pracy, Doktorantka powinna wyodrębnić rozdział Materiał i metody, w którym także mogła umieścić treści zawarte w suplementach umieszczonych po publikacjach nr 2 i 3. W tym rozdziale powinny także być wykazane zastosowane metody statystyczne wykorzystane przez Doktorantkę do analizy wyników, które zamieściła jako podrozdział 3.8 w Omówieniu wyników.

Nieliczne uwagi, które poczyniłem, nie obniżają mojej jednoznacznie pozytywnej oceny pracy.

Biorąc pod uwagę całość rozprawy uważam, że jest to układ dopuszczalny i odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim o profilu biologicznym.

5. Podsumowanie i wniosek końcowy

Praca doktorska pt. „Aktywność związków porfiryńowych wobec mikrosporydiów *Nosema ceranae* powodujących nosemozę pszczoł miodnych” jest bardzo wartościowa zarówno pod względem naukowym, jak i praktycznym. Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy aktualnych problemów związanych z poszukiwaniami metod i czynników, dzięki którym możliwa byłaby redukcja inwazyjności *Nosema ceranae* oraz sposobów leczenia nosemozy pszczoły miodnej. Uzyskane wyniki doświadczeń wykorzystane w publikacjach wchodzących w skład cyklu składającego się na rozprawę doktorską zostały w pełni udokumentowane i zaprezentowane w sposób czytelny, również na wykresach i w tabelach (zamieszczonych w tych publikacjach).

Na podstawie analizy przedstawionej mi do oceny treści pracy uważam, że Doktorantka dokonała trafnego wyboru tematyki swoich badań, a praca stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego. Przedstawiona dysertacja nawiązuje do aktualnej wiedzy i wnosi do niej nowe treści. Cele rozprawy Doktorantka sformułowała poprawnie, a w efekcie przeprowadzonych badań zostały one osiągnięte i potwierdzone uzyskanymi wynikami. Przedstawiona przez Doktorantkę metoda dezaktywacji spor *Nosema*, jeśli zostanie potwierdzona badaniami terenowymi (na rodzinach pszczelich) ma znaczne szanse na wdrożenie do praktyki pszczelarskiej, co wpisuje się w ogólną tendencję prowadzonych badań naukowych, związaną z zastosowaniami aplikacyjnymi i wdrożeniowymi. Opiniowana

rozprawa została przygotowana starannie. Wyczerpująco omawia zastosowany warsztat badawczy, przeprowadzone badania i analizy wyników oraz prawidłowo formułuje ciekawe i istotne dla dalszych badań wnioski.

Zaprezentowane w pracy wyniki badań są unikalne w skali krajowej i międzynarodowej, cenne zarówno z naukowego punktu widzenia, jak i potencjalnego zastosowania praktycznego. Wnoszą elementy nowej wiedzy do dyscypliny nauki biologiczne. Zgromadzony w ramach realizacji pracy obszerny materiał badawczy, wykorzystany w trzech oryginalnych pracach naukowych tworzących cykl wchodzący w skład rozprawy, może zostać wykorzystany do dalszej analizy naukowej.

Autorka pracy, pani mgr Katarzyna Buczek, wykazała się umiejętnością samodzielnego formułowania i rozwiązywania problemów naukowych i reprezentuje wysoki poziom wiedzy w zakresie tematyki rozprawy.

Wysoko oceniam poziom rozprawy, intelektualny wkład Autorki oraz nakład włożonej pracy. Biorąc pod uwagę, sformułowane powyżej opinie wyrażam jednoznaczne stanowisko, że opracowanie pani mgr Katarzyny Buczek pt.: „Aktywność związków porfiryńowych wobec mikrosporydiów *Nosema ceranae* powodujących nosemozę pszczół miodnych”, zgodnie z ustawą z o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, Poz. 595, z dnia 14.03.2003r., nowelizowana Dz. U. nr 84 poz. 455 z dnia 18.03.2011r.), spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim oraz mieści się w dyscyplinie nauki biologiczne. Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie jej do publicznej obrony.


Dr hab. inż. Adam Roman, profesor uczelni
-2-