

dr hab. Leszek Rolbiecki, prof. UG
Uniwersytet Gdański
Wydział Biologii
Katedra Zoologii Bezkręgowców i Parazytologii
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 14.06.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Joanny Pawlak

Transmission of parasites by marine crustaceans which constitute food of cod, *Gadus morhua* from the Southern Baltic [Transmisja pasożytów przez skorupiaki morskie stanowiące pokarm dorsza, *Gadus morhua* z południowego Bałtyku]

wykonanej pod kierunkiem pani prof. dr hab. Magdaleny Podolskiej i promotora pomocniczego pani dr Katarzyny Nadolnej-Ałtyn w Morskim Instytucie Rybackim – Państwowym Instytucie Badawczym Gdyni

Wbrew pozorom cykle życiowe wielu pasożytów, nawet tych o dużym znaczeniu dla człowieka i pospolitych, są słabo poznane. Szczególnie dotyczy to gatunków o szerokim rozprzestrzenieniu geograficznym oraz heteroksenicznych, wielożywicielskich cyklach życiowych. Nieznane są pełne kręgi żywicielskie, zarówno na poziomie żywicieli pośrednich, ostatecznych, czy paratenicznych. Stosunkowo najlepiej poznani są żywiele w obrębie kręgowców. Z kolei wiedza dotycząca roli zwierząt bezkręgowych, jako żywicieli dla wielu poznanych gatunków pasożytów, jest fragmentaryczna i najczęściej ogranicza się do badań eksperymentalnych, które nie zawsze oddają rzeczywisty mechanizm zarażenia. Taką grupą pasożytów są m.in. nicienie ze środowisk morskich, w tym rodzaje *Anisakis*, *Contracaecum* i *Hysterothylacium*, wcześniej wszystkie zaliczane do rodziny Anisakidae; obecnie *Hysterothylacium* przeniesiono do Raphidascarididae.

Poznanie cykli życiowych wymienionych nicieni, zwłaszcza rodzajów *Anisakis* i *Contracaecum*, jest szczególnie ważne, nie tylko ze względu na powszechność występowania, szeroki krąg żywicielski i duże znaczenie w łańcuchach troficznych środowiska morskiego, ale też zagrożenia zoonotyczne. Stąd podjęta tematyka dotycząca określenia zarażenia wybranych skorupiaków *in situ*, przez panią mgr Joannę Pawlak jest w pełni uzasadniona.

Ocena formalna

Rozprawę doktorską pani mgr Joanny Pawlak stanowi spójny tematycznie zbiór artykułów naukowych; w jej skład wchodzi trzy oryginalne prace, opublikowane w międzynarodowych, renomowanych czasopismach, w latach 2018, 2019 i 2021:

1. Pawlak J., Nadolna-Ałtyn K., Szostakowska B., Pachur M., Podolska M. 2018. *Saduria entomon* infected with *Hysterothylacium aduncum* found *in situ* in the stomach of cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea. *Journal of Helminthology* 92, 645-648.
2. Pawlak J., Nadolna-Ałtyn K., Szostakowska B., Pachur M., Bańkowska A., Podolska M. 2019. First evidence of the presence of *Anisakis simplex* in *Crangon crangon* and *Contracaecum osculatatum* in *Gammarus* sp. by *in situ* examination of the stomach contents of cod (*Gadus morhua*) from the southern Baltic Sea. *Parasitology* 146, 1699-1706.
3. Pawlak, J. 2021. *In situ* evidence of the role of *Crangon crangon* in infection of cod *Gadus morhua* with nematode parasite *Hysterothylacium aduncum* in the Baltic Sea. *Parasitology* 148, 1691-1696.

Monotematyczny cykl publikacji dotyczy transmisji nicieni przez skorupiaki morskie stanowiące pokarm dorsza w wodach południowego Bałtyku, choć tytuł rozprawy doktorskiej sugeruje szerszy kontekst („Transmisja pasożytów...”). Tymczasem w badaniach uwzględniono tylko nicienie, dlatego precyzyjniejsze byłoby ujęcie „Transmisja pasożytniczych nicieni przez skorupiaki...”. Mimo tej uwagi tytuły poszczególnych publikacji są zbieżne z ich treścią – mowa jest o konkretnych nicieniach i skorupiakach. Być może planowano szerszy zakres badań, co nie znalazło odzwierciedlenia w uzyskanych wynikach.

W kwestii wkładu Autorki w powstanie poszczególnych publikacji to jedna z prac jest samodzielnym dziełem/osiągnięciem pani J. Pawlak, a dwie pozostałe są wieloautorskie; jednak w obu publikacjach jest Ona autorem wiodącym (pierwszym i korespondencyjnym); była też autorem ostatecznej koncepcji badań, statystycznego opracowania danych oraz brała udział w opracowaniu metodyki badań, analizach składu pokarmu dorszy, analizach parazytologicznych i opracowaniu manuskryptu.

Ponadto przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera także streszczenie w języku polskim i angielskim wraz z bibliografią oraz życiorys naukowy Doktorantki.

Ocena merytoryczna

Dorsz jest jednym z najbardziej eksploatowanych komercyjnie w skali świata gatunków ryb. Ryba ta jeszcze niedawno pospolicie występowała w Bałtyku; obecnie z uwagi na drastyczny spadek liczebności, narażona jest na wyginięcie. Z uwagi na drapieżny tryb życia, podejmowanie wędrówek i stosunkowo długi okres życia, dorsz bywa żywicielem pasożytów z różnych grup systematycznych, pełniąc w zależności od gatunku pasożyta, rolę żywiciela pośredniego, paratenicznego, czy ostatecznego. Bardzo często ryba ta ulega zarażeniu wspomnianymi nicieniami z *Anisakis*, *Contracaecum* i *Hysterothylacium*. Spożywanie przez człowieka surowych lub półsurowych dorszy może stanowić zagrożenie chorobą anisakidozą, objawiającą się bólami brzucha, nudnościami, biegunkami, wymiotami; ponadto martwe nicienie mogą być przyczyną

alergii. Jest to szczególnie istotne, zwłaszcza w kontekście opisywanego od jakiegoś czasu wzrostu zarażenia dorszy z Morza Bałtyckiego nicieniami *Contraeaecum*. Nie należy też zapominać o tym, że pasożyty, np. nicienie *Contraeaecum* mogą negatywnie wpływać także na kondycję ryb – np. prowadząc do spadku masy ciała, czy znacznej redukcji tłuszczu w wątrobie, co z kolei obniża wartość komercyjną dorszy.

Mimo dobrego poznania parazytofauny dorsza z Morza Bałtyckiego, zwłaszcza z rejonu zachodniego, brak jest informacji dotyczących mechanizmów transmisji pasożytów pomiędzy zwierzętami bezkręgowymi (skorupiakami) a tymi rybami.

Zatem celem badań Doktorantki było określenie możliwych źródeł zarażenia dorszy z rejonu Morza Bałtyckiego nicieniami, na podstawie analizy parazytofauny skorupiaków występujących w ich pokarmie.

W tym celu zbadano 2695 żołądków dorszy, gdzie stwierdzono ponad 24 tys. różnych taksonów zwierząt bezkręgowych, z podziałem na trzy próby: 98 żołądków (442 taksony bezkręgowców; luty, maj 2015), 916 żołądków (8801 taksony bezkręgowców; luty 2015, listopad 2015, luty 2016) i 1681 żołądków (15 467 taksony bezkręgowców; listopad 2012, 2013, luty 2013, 2014). Tu chciałbym zapytać, czy rzeczywiście w pokarmie badanych dorszy (we wszystkich próbach) występował tylko jeden gatunek z rodzaju *Gammarus*. Zebrane w terenie żołądki dorszy, wraz z zawartością, były mrożone; po rozmrożeniu w laboratorium badane były pod mikroskopem stereoskopowym, ponadto całe, nieuszkodzone skorupiaki trawiono sztucznym sokiem żołądkowym, co poprawiało ich transparentność, a tym samym widoczność pasożytów. Łącznie znaleziono tylko 15 osobników nicieni, w tym *A. simplex* (1 os.), *C. osculatum* (3 os.), *H. aduncum* (9 os.) i *Hysterothylacium* sp. (2 os.). Po wstępnej identyfikacji morfoanatomicznej, przynależność taksonomiczną potwierdzano przy użyciu analiz genetycznych. Przy okazji chciałbym spytać Doktorantkę, czy rzeczywiście wstępnie oznaczano nicienie przy użyciu mikroskopu stereoskopowego i czy widoczne były tam cechy larw *Contraeaecum* oraz *Hysterothylacium*? Wielkość prób jest wystarczająca, choć jak widać po uzyskanych wynikach (bardzo niskie parametry zarażenia), przy tego typu analizach materiał musi obejmować bardzo dużą liczbę potencjalnych żywicieli.

Należy podkreślić, że cel pracy został osiągnięty; Doktorantka wykazała, że potrafi zaplanować badania, przeprowadzić eksperymenty i zinterpretować wyniki. Za istotne osiągnięcia naukowe pani Joanny Pawlak należy uznać stwierdzenie *in situ* nicieni *Anisakis simplex*, *Contraeaecum osculatum* i *Hysterothylacium aduncum/Hysterothylacium* sp. w skorupiakach morskich pozyskanych z dorszy, w tym:

- znalezienie po raz pierwszy w skali świata u *Crangon crangon* nicieni *Anisakis simplex* (L3),
- wykazanie po raz pierwszy w Bałtyku u *Saduria entomon* nicieni *Hysterothylacium aduncum* (L4, ad.),

- wykazanie po raz pierwszy w Bałtyku u *Crangon crangon* nicieni *Hysterothylacium aduncum* (L4) oraz nieoznaczonych stadiów *Hysterothylacium* sp.,
- wykazanie po raz pierwszy w Bałtyku u *Gammarus* sp. nicieni *Contraecaecum osculatum* (L3).

Z przeprowadzonych badań wynika, że poziomy zarażenia (ekstensywność jak i intensywność) skorupiaków w Morzu Bałtyckim są bardzo niskie – znajdowano tylko pojedyncze nicienie. Niski poziom zarażenia bardzo często jest normą w tego typu badaniach (u zwierząt bezkręgowych), dlatego, jak wcześniej wspomniałem, analizy parazytologiczne powinny obejmować bardzo duże próby, co jednak może być nieco frustrujące.

Niewątpliwie są to bardzo cenne wyniki, które stanowią ważny wkład w badania nt. pasożytniczych nicieni z wód morskich. Zwłaszcza, że badane przez Doktorantkę skorupiaki, przede wszystkim duże gatunki jak *Crangon crangon* i *Saduria entomon*, stanowią jeden z podstawowych składników diety dorszy, stąd można uznać, że mogą pełnić rolę w obiegu nicieni z Anisakidae i Raphidascarididae. Szczególnie istotne są tu dane dotyczące *A. simplex*, ponieważ uważa się, że zarażone tym nicieniem ryby w rejonie Morza Bałtyckiego pochodzą głównie z cieśnin duńskich. Uzyskane dane potwierdzają wcześniejsze przypuszczenia o możliwości zamknięcia w Bałtyku cyklu życiowego tego nicienia. Jak widać na podstawie badań i dyskusji przeprowadzonej przez Doktorantkę, cykl *A. simplex* nie jest do końca poznany, szczególnie w rejonach braku typowych żywicieli. I na pewno potrzebne są dalsze badania zwłaszcza, że przy niskim zarażeniu trudno jednoznacznie określić udział (np. wskazanie głównego żywiciela pośredniego) wymienionych skorupiaków w cyklu życiowym tego nicienia. Być może cykl *A. simplex* zachodzi w Morzu Bałtyckim w ograniczonym zakresie, tj. zamyka się w ramach małego odsetka żywicieli. W każdym razie dotychczasowe badania wskazują na duże przystosowanie *A. simplex* do różnych warunków środowiska, objawiające się np. kolonizowaniem innych, nowych żywicieli, przy braku typowych Euphasiacea. Klimpel i wsp. (2004) stwierdzili larwy L3 *A. simplex* w widłonogach *Paraeuchaeta norvegica*, a Kjøie i wsp. (1995) wykazali larwy L3 nawet w jajach. Choć wydaje się mało prawdopodobne, aby larwy w jajach były inwazyjne dla żywicieli ostatecznych. Na pewno kręgi żywicielskie tego nicienia są szersze i dotyczą wszystkich etapów cyklu życiowego, nawet jak pisze Doktorantka, żywicieli ostatecznych, gdzie oprócz waleni udział mogą mieć inne morskie ssaki, np. pospolita w Morzu Bałtyckim, foka *Halichoerus grypus*. Co prawda, nie ma bezpośrednich dowodów na rozmnażanie *A. simplex* w fokach, ale nie można tego wykluczyć.

W kontekście planów naukowych Doktorantki, które w pełni popieram, pozytywne były badania rozszerzone o skorupiaki, także z innych grup, odławiane bezpośrednio z Morza – uniknęłoby się wtedy, wspomnianego w rozprawie prawdopodobieństwa migracji i zarażenia nicieniami skorupiaków w żołądku dorsza. Zresztą podczas sekcji często obserwuje się migrację nicieni ze światła żołądka żywiciela (zwłaszcza u drapieźników) do pokarmu. Z drugiej strony

możliwa jest też odwrotna sytuacja – migracja nicieni z pokarmu/skorupiaka do żołądka ryby. W związku z tym mam pytanie – być może jest to słabo widoczne na zdjęciu (artykuł 1, ryc. 1), ale Autorka pisze, że *H. aduncum* znaleziono w jamie ciała skorupiaków, podczas gdy na zdjęciu wydaje się, że nicien w większości jest na zewnątrz skorupiaka. Dodatkowe analizy, o których także wspomina Doktorantka, jak np. wiek/wielkość, rejon występowania/żerowania żywicieli, czy pory roku/sezon mogą też mieć istotne znaczenie dla występowania pasożytów, a tym samym dla lepszego poznania biologii tych nicieni, ale to już pomysł na kolejne badania, które z racji swojej pracochłonności trzeba odłożyć na przyszłość. Jednocześnie, mam pytanie do Doktorantki, dotyczące cyklu życiowego *A. simplex*, a mianowicie jakie muszą być spełnione warunki, aby doszło do zamknięcia cyklu życiowego tego nicienia w Morzu Bałtyckim. Ponadto jakiej płci był znaleziony u *S. entomon* dorosły osobnik *H. aduncum*; jeśli samica, to czy w macicy były widoczne jaja – jest to ważne w kontekście roli żywiciela ostatecznego i zdecydowanie ważniejsze niż stwierdzenie samców, o którym piszą, cytowani Luque i wsp. (2007). Proszę też o komentarz na temat pozycji systematycznej nicieni *H. aduncum* i *H. auctum* oraz wskazanie u jakich żywicieli występują w Bałtyku.

Uwagi

- W podsumowaniu publikacji nr 1, Autorka pisze, że u *S. entomon* nie notowano wcześniej pasożytów, tymczasem u tego skorupiaka w Zatoce Gdańskiej stwierdzono orzęski *Mesanothryx* (Wiackowski i wsp. 1999) uważane za pasożyty przygodne (fakultatywne), a w innych rejonach świata notowano u podwoja wielkiego także myksosporidiiowce *Myxidium* (Korczyński 1988).
- W streszczeniu Autorka wymienia różne gatunki skorupiaków z Bałtyku, u których stwierdzono nicienie i kolcogłowy, zabrakło tu jednak odniesienia do publikacji Markowskiego (1937), zresztą nie jest ona cytowana w żadnej z publikacji stanowiącej rozprawę doktorską. Stanisław Markowski, nb. związany ze Stacją Morską w Helu, jako jeden z pierwszych badał cykl życiowy *H. aduncum*; w 1937 roku powstała praca „Über die Entwicklungsgeschichte und Biologie des Nematoden *Contraecum aduncum* (Rudolph, 1802)”, w której Autor opisuje jak eksperymentalnie zarażał widłonogi *Acartia biflora* oraz *Eurytemora affinis*, o tym drugim gatunku brak informacji. Ponadto Doktorantka w streszczeniu pisze, że „Nicienie *Hysterothylacium aduncum* są pasożytami jelitowym”, tymczasem tak jest tylko w odniesieniu do stadiów dorosłych i L4, które żyją w przewodzie pokarmowym, zaś larwy L3 żyją w jamie ciała ryb (kreska, wątroba, wyrostki pyloryczne), co prawidłowo przedstawiono w źródłowej publikacji nr 3.
- W streszczeniu w języku polskim, zamiast określenia „nośnik” pasożytów lepiej byłoby użyć „wektor”, co prawda najczęściej stosowanym w odniesieniu do krwiopijnych stawonogów, ale pojęcie „wektor” można też odnieść do innych pasożytów. Zamiast „zainfekowanych” lepiej używać „zarażonych”; w literaturze anglojęzycznej istnieje tylko jedno pojęcie „infection” oznaczające

ogólny stan skolonizowania żywiciela przez patogeny, w tym pasożyty. W polskiej nomenklaturze istnieją dwa pojęcia – „zakażenie” (infekcja), stosowane w odniesieniu do bakterii, wirusów i grzybów oraz „zarażenie” stosowane w odniesieniu do eukariotycznych pasożytów. Zamiast „dorszy bałtyckich” powinno być „dorszy z Bałtyku” lub „dorszy z południowego Bałtyku” tak jak jest w tytule rozprawy; zapis „dorszy bałtyckich” sugeruje, że jest to gatunek. Intensywność zarażenia to liczba pasożytów dzielona przez liczbę zarażonych żywicieli, a nie tylko żywicieli.

Oczywiście powyższe uwagi nie mają znaczenia dla interpretacji wyników w rozprawie doktorskiej pani J. Pawlak i nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę.

Podsumowanie i wniosek

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Joanny Pawlak wnosi istotne wartości do nauki w zakresie biologii morskich nicieni z rodzajów *Anisakis*, *Contracaecum*, *Hysterothylacium* i spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr. 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z tym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki o ziemi i środowisku Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie pani Joanny Pawlak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Leszek Rolbiecki, prof. UG