

Lublin, 15.11.2018

Prof. dr hab. Teresa Urbanik-Sypniewska
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
e-mail: teresa.urbanik-sypniewska@poczta.umcs.lublin.pl
tel. 81-5375033

Recenzja

**osiągnięcia naukowego, dorobku naukowo-badawczego, organizacyjnego,
dydaktycznego i popularyzatorskiego doktora Sebastiana Gnata
dotycząca wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk
weterynaryjnych**

Podstawa opracowania:

Do oceny w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego wpłynęły następujące materiały w wersji drukowanej i elektronicznej:

- Załącznik nr. 1 kopia dyplomu potwierdzającego posiadanie stopnia naukowego doktora
- Załącznik nr. 2 autoreferat
- Załącznik nr. 3 wykaz opublikowanych prac naukowych
- Załącznik nr. 4 informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki
- Załącznik nr. 5 lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oraz raport cytowań Web of Science Core Collection przygotowane przez Bibliotekę Główną UP w Lublinie
- Załącznik nr. 6 oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Nadesłany materiał umożliwił przygotowanie oceny i zajęcie jednoznacznego stanowiska w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Podstawowe informacje o Habilitancie

Tytuł magistra biologii specjalność mikrobiologia Habilitant uzyskał 2009 roku na podstawie pracy magisterskiej „Analiza numeryczna cech fenotypowych i filogeneza genu 16S rRNA rizobiów specyficznych dla *Astragalus glycyphyllos* [L.] (traganek szerokolistny)” wykonanej na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Małek

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii specjalność mikrobiologia uzyskał w 2013 roku na podstawie rozprawy „Molekularna taksonomia bakteryjnych symbiontów *Astragalus glycyphyllos* [L.] (traganek szerokolistny)”, której Promotorem była prof. dr hab. Wanda Małek.

Przebieg kariery zawodowej

Doktor Sebastian Gnat od 2014 roku do dnia dzisiejszego jest adiunktem w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej, Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Wcześniej w latach 2009-2012 był zatrudniony jako starszy referent inżynieryjno-techniczny w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii Biotechnologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie a od 2012 do 2014 roku jako asystent w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej, UP w Lublinie. Aktualna tematyka badawcza dr Sebastiana Gnata jest związana z identyfikacją gatunkową grzybów dermatofitycznych opartą na analizie markerów morfologicznych i molekularnych. Wyniki różnicowania szczepów na podstawie metod fenotypowych oraz analizy filogenetycznej mają znaczenie kliniczne i epidemiologiczne. Metody analizy molekularnej Habilitant zastosował z powodzeniem do badań mikrobiomu układu pokarmowego, bakterii: patogennych, probiotycznych i symbiotycznych, mikrosporydiów z rodzaju *Nosema*, syncytialnego wirusa układu oddechowego bydła oraz owadów z rodziny *Apionidae* (Pędrusiowate).

Ocena osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę habilitacji

Przedstawionym do oceny osiągnięciem naukowym jest cykl 5 publikacji powiązanych tematycznie zatytułowanych: **„Doskonalenie metod diagnostyki dermatofitów zoofilnych w aspekcie molekularnej identyfikacji gatunkowej, typowania epidemiologicznego i oceny stopnia wirulencji”**.

Tematem cyklu prac są badania molekularne dermatofitów, grupy keratynofilnych patogennych grzybów, które powodują infekcje skóry, włosów i paznokci. Najczęstszą

przyczyną zakażeń są dermatofity z rodzajów *Trichophyton* complex, *Microsporum* i *Epidermophyton*. Ich identyfikacja jest ważna z przyczyn epidemiologicznych i terapeutycznych. Problemem współczesnej taksonomii tej grupy grzybów jest niewielka ilość różnic sekwencji określonych regionów DNA, zmienność fenotypowa oraz zjawisko pleomorfizmu.

Diagnostyka molekularna dermatofitów oparta jest głównie na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) lub molekularnym odcisku palca (profilu białkowego uzyskanego metodą MALDI TOF). Jedną z najczęściej stosowanych metod uważanych za „złoty standard” jest PCR, w którym amplifikowane są sekwencje ITS regionów rDNA.

Cykl rozpoczyna publikacja z 2015 r. **“Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species”**. Celem jej była identyfikacja do gatunku i znalezienie różnic wewnątrzgatunkowych szczepów z rodzaju *Trichophyton* complex izolowanych od ludzi oraz zwierząt ze zmianami skórnymi i bez symptomów dermatofitozy przy pomocy metod fenotypowych i typowania genomowego: mapowanie PCR-RFLP produktów PCR sekwencji ITS (ITS-internal transcribed sequences) fragmentów regionu rDNA, (18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S) kodującego rybosomalne RNA. Wyniki badań potwierdziły wysoki potencjał różnicujący sekwencji ITS, nadający się do identyfikacji gatunku oraz detekcji różnic wewnątrz gatunków *Trichophyton*. Różnice wewnątrzgatunkowe określone na podstawie wzorów RFLP mogą wskazywać na pochodzenie szczepów i znaleźć zastosowanie do badań epidemiologicznych. Do szczególnych osiągnięć należy opracowanie i standaryzacja procedur analiz morfologicznych oraz molekularnych do identyfikacji izolatów klinicznych w kierunku rozpoznania *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* i *Microsporum canis*. Wykazano, że w przypadku molekularnej identyfikacji stadiów doskonałych dermatofitów, nie występuje korelacja z morfotypowaniem. Technika, o znacznej przewadze diagnostycznej pozwalającą na rejestrację różnic gatunkowych i grupowanie *Trichophyton* complex do gatunków *Arthroderma benhamiae*, *A. vanbreuseghemii* oraz *T. interdigitale* jest sekwencjonowanie ITS, natomiast metoda ITS-RFLP ma mniejszą zdolność dyskryminacyjną. Należy podkreślić, że do konstrukcji filogramów metodą (ML, ang. Maximum Likelihood) w tej i dwu kolejnych publikacjach wchodzących w skład cyklu, Habilitant wykorzystał technikę, w której podstawę określania odległości ewolucyjnych pomiędzy analizowanymi organizmami, stanowił optymalnie dobrany, według kryterium informacyjnego Akaike, model podstawień nukleotydowych. Otrzymane filogramy dla szczepów izolowanych z różnych gospodarzy

ilustrują odmienne pochodzenie filogenetyczne gatunków klasyfikowanych jako *T. mentagrophytes* complex i ich krótką wspólną drogę ewolucyjną.

Druga (chronologicznie) publikacja „**Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes**” z 2017 roku dotyczy oceny preparatów DNA do genotypowania dermatofitów o największym znaczeniu epidemiologicznym w Europie: *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* i *T. verrucosum*, pochodzących od zwierząt hodowlanych i od osób zajmujących się hodowlą oraz od zwierząt towarzyszących i ich właścicieli.

Porównano efektywność izolacji i jakość preparatów DNA izolowanych metodami niestandardowymi: fenol-chloroform i „CTAB” oraz zestawami komercyjnymi z hodowli płynnych i stałych w różnych fazach wzrostu. Stosując jako kryterium czystości preparatów wartość współczynnika A260 nm do A280 nm oraz polimorfizm określonych sekwencji DNA (PCR-MP (PCR-Melting Profile, PCR fragmentów DNA różniących się stabilnością termiczną) i PCR ITS ze starterami obejmującymi obydwie sekwencje ITS), Habilitant mógł ustalić optymalny czas hodowli do izolacji DNA. W wyniku tych obserwacji stwierdzono, że nie czas trwania hodowli lecz odpowiednia faza wzrostu decyduje o przydatności DNA. Po porównaniu stopnia zróżnicowania amplikonów otrzymanych metodą PCR-MP stwierdzono, że preparaty otrzymane z zastosowaniem komercyjnych zestawów ekstrakcyjnych zawierają zanieczyszczenia, które zakłócają przebieg i wynik typowania wewnątrzgatunkowego. Wyniki przedstawione w tej pracy poza walorem merytorycznym mają wysoką wartość empiryczną.

Muszę zwrócić uwagę, że w całym tekście tej publikacji nie pojawiło się wyjaśnienie skrótu CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide, bromek heksadecylotrimetyloamoniowy).

Pierwszy z trzech artykułów opublikowanych w 2018 roku “**Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm**” dotyczy analizy fenotypowej i genotypowej szczepów dermatofitów wyizolowanych od lisów z jednej fermy hodowlanej. Na podstawie obserwacji makro- i mikromorfologicznych zostały one określone jako różne formy *T. mentagrophytes*. Do badania filogenetycznego zastosowano analizę polimorfizmu ITS, do genotypowania metodę PCR-MP a do detekcji aktywności keratynolitycznej sekwencję genu *chs-1* dla syntazy chitynowej. Stwierdzono zgodność zróżnicowania fenotypowego z wzorami genotypowymi oznaczonymi metodą PCR-MP, która ujawniła profile 4 różnych szczepów wyizolowanych od jednego zwierzęcia. Koinfekcja organizmu zwierzęcego przez różne szczepy patogenu wskazuje na potrzebę szczegółowej identyfikacji izolatów i ustalania źródła zakażenia ze

względem na wybór właściwego postępowania terapeutycznego z uwagi na to, że *T. mentagrophytes* complex należy do dermatofitów zoofilnych, które wywołują zakażenia u ludzi.

Sekwencje ITS opublikowane w tej pracy lokowały wszystkie izolaty w monofiletycznej grupie wraz z *Trichophyton mentagrophytes*. Większy stopień zróżnicowania stwierdzono na podstawie analizy PCR-MP. W tym przypadku, ilość grup genomowych odpowiadała zróżnicowaniu fenotypowemu. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w profilach aktywności enzymatycznych, co uniemożliwiło wskazanie szczepów o większym potencjale chorobotwórczym.

Systematyka grzybów dermatofilnych z rodzaju *Trichophyton* ulega ciągłym modyfikacjom. Wyniki badań prowadzonych przez Habilitanta potwierdzone danymi literaturowymi wskazują na konieczność kontynuowania badań m. in. w celu opracowanie udoskonalonych procedur diagnostycznych.

W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na definiowanie aktywności hemolitycznej ponieważ w tej publikacji Habilitant podaje za Elavashari i wsp. J. Clin. Diagn. Res. 2017 : „The haemolysins are the lipids and proteins”. Uważam, że należałoby uściślić tę definicję podając, że większość hemolizyn jest białkami a część biosurfaktantami o charakterze lipidów.

W publikacji **“Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains”** Habilitant dowiódł, że przy pomocy aktualnie stosowanych metod można zweryfikować identyfikację dermatofitów z próbek zabezpieczonych przed wieloma latami.

Badania dotyczyły zakażeń u hodowców bydła wywołanych przez *T. verrucosum*, który należy do dermatofitów zoofilnych coraz częściej izolowanych od bydła oraz od osób trudniących się hodowlą. W celu precyzyjnego ustalenia gatunku dermatofitu wyniki badań uzyskanych metodami konwencjonalnymi porównywano do otrzymanych za pomocą: analizy sekwencji ITS, które wykazały, że wszystkie izolaty tworzą monofiletyczną grupę ze szczepem referencyjnym *T. verrucosum*. Amplifikacja sekwencji metodą PCR-MP oraz metodą (PCR-MSP, Microsatellite primed-PCR, z zastosowaniem oligonukleotydowych sekwencji starterowych) nie generowała profili sekwencyjnych o sile dyskryminacyjnej wystarczającej do różnicowania szczepów na poziomie gatunku. Badania retrospektywne szczepów pochodzących od krów i owiec z różnych gospodarstw oraz od hodowców

pracujących w tych gospodarstwach, zebranych na przestrzeni 40 lat potwierdziły dużą stabilność genomową tego gatunku.

Można mieć pewne wątpliwości co do wnioskowania o podobieństwie izolatów od trzech różnych gospodarzy na podstawie słabo wyodrębnionych prążków (Fig. 6, str. 687).

W tabeli 1 dostrzegłam błąd w nazwie miasta „Janów lubelski”.

Tematem ostatniej publikacji: **“Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans”**

było poszukiwanie korelacji między profilami enzymatycznymi dermatofitów a fenotypowym obrazem wywoływanych przez nie zmian przez porównanie izolatów od zwierząt z objawami i bez objawów grzybicy. W wyniku zastosowania wystandaryzowanych metod ustalono, że profil enzymów związanych z patogennością szczepów *Trichophyton mentagrophytes*, *T. verrucosum* i *Microsporum canis* jest związany z właściwościami tkanki gospodarza. Wyjątkiem była keratynaza, której obecność stwierdzano niezależnie od gatunku zwierzęcia. Elastaza natomiast, podobnie jak aktywność hemolityczna, była powiązana ze zdolnością do zakażenia ludzi.

W tabeli 2 zauważyłam błąd: % aktywnych szczepów DNase-positive $40/61 = 65\%$ a nie 58%.

Przedstawione do oceny publikacje potwierdzają, że zastosowanie sekwencjonowania amplikonów ITS jest bardzo czułą metodą identyfikacji gatunków oraz analizy filogenetycznej większości izolatów klinicznych. Ponadto wykazano, że klasyfikacja oparta na kryteriach molekularnych nie zawsze pokrywa się z opartą na kryteriach morfologicznych i klinicznych. Podsumowując osiągnięcie naukowe dr S. Gnata należy stwierdzić, że uzyskane przez Niego wyniki mają znaczenie zarówno w badaniach zależności ewolucyjnych jak i diagnostyce dermatofitów.

Do szczególnych osiągnięć Habilitanta należy zaliczyć:

- badanie aktywności enzymatycznych połączone z próbą znalezienia korelacji między profilem enzymatycznym a obrazem zmian chorobowych
- wykazanie, że przy ekspozycji na dermatofity zoofilne istnieje wysokie ryzyko zarażenia związane z ciągłym kontaktem ludzi z chorymi zwierzętami
- stwierdzenie, że cechy makromorfologii kolonii dermatofitów powinny zostać utrzymane w ścieżce diagnostycznej, gdyż nie tylko umożliwiają zaklasyfikowanie grzybów do grupy dermatofitów ale różnicują gatunki *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* i *M. canis*.

- udokumentowanie dotychczas nie opisywanego w literaturze naukowej jednoczesnego zakażenia jednego osobnika (lis) czterema szczepami *T. mentagrophytes*, co zostało potwierdzone badaniami genomowymi
- wykazanie, że metoda ekstrakcji DNA mieszaniną fenol-chloroform jest optymalna pod względem wydajności i jakości preparatu DNA do analiz genomowych
- potwierdzenie zastosowania amplifikacji genu *chs-1* w rutynowej analizie dermatofitoz z uwagi na znaczące przyspieszenie diagnostyki i wysoce powtarzalne wyniki, znajdujące potwierdzenie w bazie NCBI
- stwierdzenie większej zdolności różnicującej sekwencji ITS w porównaniu z metodą ITS-RFLP do identyfikacji i ustalania filogenezy klinicznych izolatów *T. mentagrophytes*
- wprowadzenie kryterium informacyjnego Akaike jako udoskonalenie do ustalania konstrukcji filogramów metodą największego podobieństwa
- określenie relacji filogenetycznych między izolatami *T. floccosum* oraz *T. mentagrophytes* wskazujące na odmienne pochodzenie gatunków klasyfikowanych jako *T. mentagrophytes* complex
- zastosowanie metod o wysokiej sile dyskryminacyjnej: MSP-fingerprinting (MicroSatellite Primed fingerprinting) oraz PCR-MP (PCR Melting Profile) do określania stopnia zróżnicowania genomowego szczepów klinicznych dermatofitów
- potwierdzenie wysokiej stabilności genomu *T. verrucosum* w badaniach retrospektywnych
- odwzorowanie filogenezy na podstawie heterogenności sekwencji ITS dermatofitów i wykazanie, że szczepy kliniczne różnych gatunków dermatofitów tworzą monofiletyczne grupy z gatunkami referencyjnymi
- umieszczenie sekwencji ITS w bazach NCBI, co zwiększyło zasoby stanowiące podstawę do badania filogenezy dermatofitów.

O wiodącym udziale Pana dr Sebastiana Gnata w powstaniu prac przedstawionych do oceny świadczy fakt, że w czterech z nich jest On pierwszym i korespondencyjnym autorem. W pierwszej publikacji z roku 2015 Habilitant ocenił swój udział na 27%, w pozostałych publikacjach z ostatnich dwu lat jest on bardzo wysoki, oceniony na 90%. Łączny IF według listy JCR pięciu prac stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi: **11.159**, według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: **145** pkt., przy ilości cytowań **3**. Powodem niskiej cytowalności jest czas ich (publikacje nr 2-5) ukazania się (rok 2017 i bieżący).

Ocena pozostałego dorobku naukowego (niewchodzącego w skład osiągnięcia)

Dotychczasowy dorobek naukowy Habilitanta obejmuje współautorstwo w **23** pracach oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, w tym w **12** pracach oryginalnych opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, jednej pracy przeglądowej, **26** komunikatach zjazdowych oraz **10** referatach wygłoszonych na konferencjach międzynarodowych.

Sumaryczny **impact factor** według listy Journal Citation Reports na dzień **22.05.2018** roku wynosi **44,328** a sumaryczna ilość punktów MNiSW **615**. Większość publikacji (**12**) powstała po uzyskaniu stopnia naukowego doktora: ich IF wynosi **21,787**, w porównaniu do **7** publikacji o łącznym IF wynoszącym **11,762** przed uzyskaniem stopnia doktora oraz ilości punktów MNiSW, odpowiednio: **300** i **170**.

Według bazy Web of Science (WoS) do dnia **22 maja 2018** roku liczba cytowań wszystkich publikacji wynosi **77** (bez autocytowań) a indeks Hirscha: **6**.

Należy podkreślić, że wartości parametryczne dorobku naukowego zostały sporządzone zgodnie z aktualnie obowiązującymi wymogami a wartość indeksu cytowań podano zgodnie z rokiem opublikowania, natomiast dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: nr 2 (opublikowanej w 2017 roku) i nr 3, 4 i 5 (opublikowanych w wersji online w 2018 roku) podano aktualne dane z roku 2016.

Problematyka badań, którymi zajmował się Habilitant przed doktoratem oraz po uzyskaniu stopnia doktora dotyczyła diagnostyki mikrobiologicznej, wielokierunkowej taksonomii drobnoustrojów oraz koncepcji i definicji gatunku bakteryjnego. W trakcie przygotowania pracy magisterskiej korzystał z narzędzi bioinformatycznych do badania pokrewieństwa ewolucyjnego mikroorganizmów. Początkowo jako student a potem pracownik Zakładu Genetyki i Mikrobiologii współpracował z zespołem Pani prof. dr hab. Wandy Małek i zajmował się określaniem właściwości fenotypowych, genomowych i badaniem relacji filogenetycznych mikrosymbiontów traganka szerokolistnego (*Astragalus glycyphyllos*). Na podstawie analizy numerycznej wykazał, że tworzą one wspólną grupę z bakteriami symbiotycznymi z rodzaju *Mesorhizobium*, co potwierdziła analiza sekwencji genu 16S rRNA oraz wzorów RFLP-16S rDNA. Do określania stopnia zróżnicowania genomowego symbiontów *A. glycyphyllos* wykorzystał analizę numeryczną profili DNA uzyskanych metodami RAPD, ERIC oraz AFLP. W celu różnicowania niższych taksonów, tj. gatunków i podgatunków badał sekwencje, które charakteryzują się większą siłą dyskryminacyjną tj. geny metabolizmu podstawowego oraz stosował analizę MLSA (ang.

multi-locus sequence analysis), hybrydyzację DNA-DNA i określanie zawartości % mol G+C. W badaniach genealogii ryzobiów jako składnik ich drogi ewolucyjnej badał sekwencje genów symbiotycznych; *nod* i *nif*. Na tej podstawie Habilitant mógł stwierdzić, że droga ewolucyjna symbiotycznej i niesymbiotycznej części genomu badanych bakterii była zgodna, i że na jej przebieg nie miał wpływu międzyrodzajowy transfer genów.

Cztery prace: Anton Leeuw., Int. J. G.: 2014 (udział Habilitanta 80%); J. Appl. Genet.: 2015 (udział Habilitanta 80%); Plos One: 2015 (udział Habilitanta 80%); Int. J. Syst. Evol. Microbiol.: 2016, (udział Habilitanta 75%) weszły w skład cyklu, wyróżnionego Nagrodą Naukową II stopnia im. Prof. Edmunda Mikulaszka Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w 2016 roku.

Podobne badania mikrosymbiontów, z udziałem dr S. Gnata wykonano na izolatach *Robinia pseudoacacia* rosnących w Polsce i w Japonii. Również w tym przypadku mikrosymbionty z rodzaju *Amorpha* spp. tworzyły wspólne grono z rodzajem *Mesorhizobium*. Wyniki tych prac zostały opublikowane w Arch. Microbiol.: 2010 z 15% udziałem Habilitanta.

Doświadczenie uzyskane w badaniach molekularnych mikroorganizmów Pan dr S. Gnat wykorzystał we współpracy z zespołami naukowymi spoza macierzystej jednostki.

Włączył się do badań owadów należących do rodziny Pędrusiowate (*Apionidae*) prowadzonych w Zakładzie Botaniki i Mykologii UMCS oraz Zakładzie Zoologii UP. Przy udziale Habilitanta opracowano rozwiązanie zastosowane do identyfikacji i systematyki tych owadów, polegające na analizie sekwencji nukleotydowej genu dla podjednostki mitochondrialnej oksydazy cytochromowej 1 (COI, COX1, CO1). Procedurę otrzymywania mitochondrialnego DNA użyto z powodzeniem do okazów muzealnych przechowywanych przez wiele lat. Otrzymane sekwencje porównywano z sekwencjami genu COI zdeponowanymi w bazie NCBI oraz z innymi w tym genu 18S rRNA. Skonstruowano drzewo filogenetyczne dla przedstawicieli 23 gatunków i 15 rodzajów, w większości zgodne z morfologicznym systemem klasyfikacji *Apionidae*. Wyniki opublikowano w J. Insect. Sci.: 2012 z 20% udziałem Habilitanta.

We współpracy z tym samym zespołem Habilitant opracował metodę, która znajdzie zastosowanie do rozróżniania mikrosporydiów grzybów wywołujących wymieranie pszczół miodnych z rodzaju *Nosema*, techniką LAMP (loop mediated isothermal amplification), polegającą na izotermicznej amplifikacji specyficznego odcinka DNA z modyfikacją, dzięki której możliwe jest rozróżnianie gatunków *N. apis* i *N. ceranae*. Wyniki zostały przedstawione w FEMS Microbiol. Lett.: 2014, w którym udział dr S. Gnata wynosi 80%.

Ważne miejsce w działalności naukowej dr S. Gnata zajmuje identyfikacja, systematyka oraz zjawisko oporności bakterii, dermatofitów i wirusów wywołujących zakażenia zwierząt hodowlanych i wolno żyjących. Zagadnienia związane z lekoopornością bakterii, takich jak *E. coli*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, zostały opublikowane we współpracy z pracownikami Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz Parku Narodowego „Ujście Warty”. Do określania stopnia podobieństwa szczepów stosowano wzory białkowe uzyskane przy pomocy spektrometrii masowej MALDI-TOF oraz metodę typowania całego materiału genetycznego ADSRRS-fingerprinting (Amplification of DNA fragments Surrounding Rare Restriction Sites). Wyniki zostały opublikowane w czasopismach o wysokim IF, takich jak: *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*: 2016 (udział Habilitanta wynosi 10%), *Plos One*, 2017, (udział Habilitanta wynosi 20%), *J. Med. Microbiol.*: 2017 (udział Habilitanta wynosi 10%) i *Poultry Sci.*: 2017 (udział Habilitanta wynosi 10%).

Habilitant opublikował 3 prace na temat nosicielstwa bakterii w przewodzie pokarmowym dziko żyjących zwierząt. Ukazały się one w *Lett. Appl. Microbiol.*: 2015 (udział Habilitanta wynosi 70%), *Plos One*, 2016 (udział Habilitanta wynosi 15%) i *J. Wildl. Dis.*: 2015 (udział Habilitanta wynosi 10%).

Posiadane doświadczenie (techniki spektrometrii MALDI-TOF, metody ITS-PCR i ITS-PCR-RFLP) Habilitant wykorzystał do identyfikacji i systematyki bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. jednego ze składników mikroflory układu pokarmowego gęsi, co zostało opublikowane w *Res. Microbiol.*: 2014 z udziałem Habilitanta wynoszącym 30%.

W badaniach innych czynników etiologicznych chorób zwierząt Habilitant ustalił przydatność różnych linii komórkowych do hodowli *in vitro* bydłęcego syncytialnego wirusa układu oddechowego (BRSV) a wyniki opublikował w *J. Virol. Methods*: 2014; z udziałem wynoszącym 15%.

Dr S. Gnat jest współautorem pracy (z udziałem wynoszącym 70%), którą zrealizował we współpracy z Zakładem Metod Chromatograficznych Wydziału Chemii UMCS dotyczącej wrażliwości izolatów klinicznych bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, *Listeria* i *Yersinia* na składniki ekstraktów roślinnych w aspekcie ich zastosowania jako terapii uzupełniającej leczenie antybiotykami opublikowanej w *Pol. J. Vet. Sci.*: 2017.

W dorobku naukowym dr S. Gnata opublikowanym przed doktoratem znajduje się też artykuł przeglądowy (*Post. Mikrobiol.*: 2012) z 15% udziałem Habilitanta, w którym przedstawiono mechanizmy adaptacji bakterii Gram-ujemnych do różnych warunków ciśnienia osmotycznego.

Dr Gnat posiada umiejętność nawiązywania współpracy i wymiany doświadczeń między ośrodkami naukowymi krajowymi i zagranicznymi o czym świadczy współpraca z ośrodkiem naukowym we Włoszech, w ramach której odbył staż naukowy na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Pizie a także zaproszenie do wygłoszenia wykładu konferencyjnego na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Stambule.

W trakcie swojej działalności naukowej był On głównym wykonawcą lub wykonawcą w dwu projektach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki a także kierownikiem jednego projektu badawczego NCN (Miniatura) i trzykrotnie grantu przyznanego przez Prorektora UP w Lublinie d/s Nauki, Wdrożeń i Współpracy Międzynarodowej;

Habilitant był recenzentem manuskryptów dla redakcji czasopism naukowych o wysokim IF: Veterinary Research (IF: 1,99), Microbiology Open (IF: 2,747), Journal of Environmental Quality (IF: 2,987), Current Genetics (IF: 3,764) oraz przygotował ekspertyzę na zamówienie.

Podsumowując dorobek naukowy dr Sebastiana Gnata należy podkreślić, że jest on bogaty i różnorodny. Na podkreślenie zasługuje doskonale opanowany i stale poszerzany zakres metod analizy molekularnej, który umożliwia Habilitantowi badanie molekularnych podstaw identyfikacji mikroorganizmów głównie w kontekście ich właściwości chorobotwórczych. Ważnym efektem łączenia przez Habilitanta wiedzy w zakresie metod molekularnych realizowanych we współpracy z zespołami naukowymi krajowymi i zagranicznymi jest praktyczne wykorzystanie uzyskanych wyników.

Podsumowując tę część recenzji uważam, że dorobek naukowy dr Sebastiana Gnata jest znaczący i w pełni wystarczający do uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Ocena dorobku dydaktycznego, współpracy międzynarodowej i popularyzacji nauki

Dr S. Gnat ma znaczące osiągnięcia w pracy ze studentami i młodymi naukowcami, które uzyskał jeszcze trakcie zatrudnienia na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS, pracując na etacie inżynierjno-technicznym. Obecnie jako adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej prowadzi ćwiczenia laboratoryjne i wykłady z Mikrobiologii Weterynaryjnej dla studentów II i III roku kierunku weterynaria oraz wykłady z przedmiotu Ochrona Własności Intelektualnej dla studentów I roku kierunku weterynaria. Do prowadzenia tego przedmiotu Habilitant uzyskał odpowiednie kwalifikacje w wyniku

ukończenia studiów podyplomowych: **„Kształcenie kadry akademickiej do roli wykładowców przedmiotu - Ochrona własności intelektualnej”.**

Był promotorem 5 prac dyplomowych, w tym dwóch magisterskich i trzech inżynierskich studentów Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie, recenzentem dwu prac inżynierskich oraz opiekunem pracowni magisterskiej dla studentów kierunku biotechnologia w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS.

Habilitant był promotorem pomocniczym jednego zakończonego przewodu doktorskiego a obecnie jest promotorem pomocniczym w dwu przewodach doktorskich realizowanych w Instytucie Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP.

Trzykrotnie był współautorem i prowadzącym projekty prezentowane w ramach Lubelskiego Festiwalu Nauki.

Dr S. Gnat przebywał dwukrotnie na zagranicznych stażach naukowych; 1,5 miesiąca na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Pizie, Włochy oraz 8 dni na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Stambule, Turcja oraz uczestniczył w 6 krajowych warsztatach szkoleniowych.

Działalność organizatorska

Dr S. Gnat aktywnie uczestniczy w diagnostyce mikrobiologicznej prowadzonej w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej UP w Lublinie. We współpracy z Nadleśnictwem Kluczbork, jest zaangażowany w badanie występowania w aspekcie nosicielstwa potencjalnych patogenów bakteryjnych u jeleni importowanych z innych krajów europejskich do Polski w ramach programu reintrodukcji gatunku. Realizuje zlecane przez firmy farmaceutyczne prace badawcze, które dotyczą oceny jakości preparatów mikrobiologicznych.

Na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie od 2014 roku jest Sekretarzem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej.

Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, w którym od 2016 roku pełni funkcję Przewodniczącego Komisji Rewizyjnej Oddziału Lubelskiego.

Plany naukowe na najbliższą przyszłość

Habilitant planuje rozszerzenie badań nad zmiennością genetyczną i czynnikami związanymi z. patogenezą dermatofitów zoofilnych ze szczególnym uwzględnieniem *T. verrucosum* i *M. canis*, jako najczęściej występujących u ludzi grzybic powierzchniowych o etiologii zwierzęcej. Planuje On wyznaczanie zakresu gospodarza klinicznych szczepów *T. verrucosum* i innych gatunków dermatofitów, co może przyczynić się do przewidywania dróg transmisji infekcji pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt i ludźmi.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Na podstawie przedstawionych do oceny materiałów uważam, że dorobek publikacyjny Habilitanta wnosi istotny wkład w rozwój diagnostyki molekularnej dermatofitów zoofilnych i innych patogennych mikroorganizmów.

Całokształt działalności naukowej dr Sebastiana Gnata, który dał się poznać jako badacz o dużym zaangażowaniu w proces naukowy, działalność dydaktyczną i popularyzatorską, aktywne uczestnictwo w realizacji projektów naukowych i kierowanie jednym z nich, bez wątpienia kwalifikuje Go do objęcia stanowiska samodzielnego pracownika nauki.

Zarówno osiągnięcie naukowe, jak i pozostały dorobek naukowy dr Sebastiana Gnata spełniają kryteria określone w art. 16 ust. 4 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki oraz rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r. w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Biorąc to pod uwagę z pełnym przekonaniem przedstawiam pozytywną opinię w sprawie nadania dr Sebastianowi Gnatowi stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk weterynaryjnych.

Teresa Urbani-Sypniewska