Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU
KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

Poznań, 20.11.2023

Prof. UPP dr hab. inż. Anna Sip
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Zarzeckiej
pt. „Antybiotykoodporność drobnoustrojów wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych – możliwości horyzontalnego transferu genów oraz wpływ czynników środowiskowych na ekspresję oporności na antybiotyki”
wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod opieką **promotora dr hab. Anny Zadernowskiej, prof. UWM**
oraz **promotora pomocniczego dr inż. Wioletty Chajęckiej-Wierzchowskiej**

Postawa formalna opracowania recenzji

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (UWM) w Olsztynie, podjętą w dniu 29 września 2023 roku w związku z postępowaniem doktorskim wszczętym celem nadania pani mgr Urszuli Zarzeckiej stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Recenzja uwzględnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023, poz. 742 ze zm.).

Ocena istotności podjętego tematu

Nadużywanie oraz niewłaściwe stosowanie antybiotyków doprowadziło do powstania wielu szczepów chorobotwórczych opornych na działanie antybiotyków. Okazuje się, że zjawisko nabywania oporności na antybiotyki dotyczy również bakterii fermentacji mlekowej (LAB), a więc mikroorganizmów o statusie GRAS, powszechnie wykorzystywanych w przemyśle. Niestety w ostatnich latach pojawiają się prace wskazujące na to, że LAB mogą stanowić zagrożenie dla osób o obniżonej odporności immunologicznej, a także być rezerwuarem genów oporności na antybiotyki. Zbadaniem skali tego ostatniego zjawiska u LAB wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych oraz identyfikacją czynników, które mogą na nią wpływać postanowiła zająć się doktorantka. Tematyka rozprawy dotyka zatem zagadnień o istotnym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym.

Ocena strony formalnej pracy oraz dorobku doktorantki

Rozprawa doktorska pani mgr Urszuli Zarzeckiej została przygotowana na podstawie cyklu pięciu publikacji, w tym czterech oryginalnych prac twórczych. Ich sumaryczny IF wynosi 25,521, a suma punktów MEiN jest równa 580. Wskazane prace zostały opublikowane w latach 2020-2023 w prestiżowych czasopismach zakresu technologii i mikrobiologii żywności wydawnictwa Elsewier (LWT-Food Science and Technology, Food Microbiology, International Journal of Food Microbiology). Współczynnik ich wpływu mieści się w granicach od 3,714 do 6,374 (średni IF wynosi 5,1), a ich cytowalność przekracza 30. Parametry te dowodzą wysokiej wartości naukowej prac będących przedmiotem ocenianej dysertacji oraz są doskonałym potwierdzeniem zainteresowania środowiska naukowego ich tematyką. Wszystkie publikacje wchodzące w skład zgłoszonego dzieła są pracami zespołowymi. Liczba ich współautorów waha się od trzech do pięciu. Co istotne we wszystkich pracach mgr U. Zarzecka jest pierwszym autorem, a w czterech również autorem korespondencyjnym. We wszystkich publikacjach współautorami są również promotor i promotor pomocniczy. Zgodnie z oświadczeniami współautorów udział doktorantki w realizacji i przygotowaniu zgłoszonych publikacji był wiodący i wyniósł od 55 do 65% (średnio 60%). Wkład własny doktorantki został oszacowany rzetelnie, a dodatkowe informacje zawarte w opracowaniu oraz oświadczeniach współautorów sprawiają, że powyższe dane są w pełni transparentne. Z załączonych informacji wynika, że mgr U. Zarzecka wykonała większość eksperymentów i analiz. Uczestniczyła też w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, interpretacji ich wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Wart zaznaczenia jest również fakt, że badania opisane w dwóch pracach oryginalnych zostały wykonane w ramach projektu badawczego PRELUDIUM-20 (nr projektu: 2021/41/N/NZ9/00675), w którym doktorantka pełniła funkcję kierownika.

Układ przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest przejrzysty i jednocześnie typowy dla prac opartych na monotematycznym cyklu publikacji. Całość rozprawy składa się z autoreferatu podzielonego na siedem rozdziałów oraz dwóch załączników. W liczącym 68 stron autoreferacie przedstawiono krótki przegląd literatury (wstęp), cel i zakres pracy, materiały i metody badawcze, omówienie wyników badań, dyskusję, stwierdzenia końcowe oraz spis cytowanej literatury. Oprócz tego w rozprawie znalazło się streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz informacje o aktywności i imponującym już w tej chwili, dorobku naukowym doktorantki. Doktorantka poza dorobkiem publikacyjnym zgłoszonym do dysertacji, jest bowiem współautorem siedmiu publikacji naukowych, których sumaryczny IF wynosi 24,467, dwóch publikacji spoza bazy JCR, jedenastu rozdziałów w monografiach pokonferencyjnych oraz osiemnastu prezentacji posterowych. Ponadto odbyła staż naukowy w ramach programu „PROM – Stypendium wymiany międzynarodowej dla doktorantów i kadry akademickiej” w Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, pod opieką prof. María Mercedes López Fernández. Poza tym w latach 2019-2021 brała udział w wykonywaniu dwóch projektów badawczych.

Załącznikami do rozprawy są natomiast reprinty wskazanych publikacji wraz z towarzyszącymi im materiałami uzupełniającymi oraz bardzo dobrze przygotowane oświadczenia ich współautorów. W związku z tym całość rozprawy jest obszernym opracowaniem liczącym łącznie 148 stron.

W rozprawie zacytowano 97 pozycji literaturowych, które zostały bardzo dobrze wybrane. Ich cytowania w tekście dysertacji są prawidłowe. Do każdej pozycji oprócz pełnej informacji bibliograficznej, dołączono link z numerem doi, co pozwala na szybkie znalezienie ich wersji elektronicznej. Geneza badań jest świetnie wyjaśniona, omówienie ich wyników rzeczowe, a dyskusja dojrzała i jednocześnie inspirująca do podjęcia dalszych badań.

Zauważam też, że cała rozprawa jest napisana precyzyjnym, naukowym językiem i wzorowo przygotowana od strony edytorskiej.

Pod względem formalnym rozprawa spełnia zatem wszystkie wymagania stawiane pracom dysertacyjnym na stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, tj. ma charakter eksperymentalny i zawiera komplet wymaganych rozdziałów ułożonych w sekwencji typowej dla prac o charakterze doświadczalnym. Stanowi ona przy tym zwartą i logiczną całość, a jej Autorka legitymuje się bogatym dorobkiem naukowym.

Ocena merytoryczna pracy

Recenzowana praca autorstwa mgr Urszuli Zarzeckiej dotyczy antybiotykoodporności bakterii fermentacji mlekowej wykorzystywanych do produkcji żywności oraz możliwości jej rozprzestrzeniania się. Dodatkowo pokazuje jaki wpływ na ekspresję genów związanych z antybiotykoodpornością oraz częstość ich przenoszenia do innych LAB, wywierają czynniki stresowe związane z produkcją żywności, a zwłaszcza obróbka wysokociśnieniowa. Z ogromnym zainteresowaniem zapoznałam się treścią przedmiotowej rozprawy i uważam ją za bardzo wartościowe i wysoce pożądane dzieło.

Pracę rozpoczyna ośmiostronicowy wstęp literaturowy, który doskonale wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy. Wstęp ten składa się z pięciu podrozdziałów. Najpierw zarysowano w nim genezę problemów związanych z antybiotykoodpornością. Zwrócono uwagę, że zagadnienie to dotyczy nie tylko bakterii chorobotwórczych występujących w środowisku szpitalnym, ale również tych, które są powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym jako kultury starterowe i ochronne. W tym kontekście w kolejnych podrozdziałach poruszono kwestie dotyczące bezpieczeństwa szczepów stosowanych do produkcji żywności, akcentując potrzebę ich badania także pod kątem oporności na antybiotyki. W związku z tym, że składnikami wielu kultur przemysłowych są LAB, w kolejnym podrozdziale zebrano dane na temat ich oporności na antybiotyki oraz sposobów jej przenoszenia. Informacje te w połączeniu z prezentowanym dalej danymi dotyczącymi możliwości aktywacji, rozwoju i rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki w odpowiedzi na warunki stresowe, podkreśliły znaczenie badań dysertacyjnych. Ze względu na tematykę pracy podrozdziały te uważam za szczególnie interesujące, wartościowe i oryginalne. Zasygnalizowane w nich zagadnienia zostały dokładnie omówione w bardzo dobrze notowanej publikacji przeglądowej (P1: Starter cultures as a reservoir of antibiotic resistant microorganisms. LWT-Food Science and Technology, 127), zgłoszonej jako część dysertacji. Treść tej publikacji wskazuje na znakomite przygotowanie merytoryczne doktorantki. Zauważam ponadto, że zebrane w niej dane były bodźcem do podjęcia zasadniczych badań oraz pozwoliły na sformułowanie trzech hipotez badawczych, kluczowych dla realizacji celu dysertacji. Ich weryfikacja wymagała przeprowadzenia kilkuetapowych badań. Badania te zostały dobrze zaplanowane i wykonane z wykorzystaniem szerokiego wachlarza nowoczesnych metod oraz narzędzi badawczych. Bakterie wchodzące w skład kultur starterowych i ochronnych identyfikowano techniką spektrometrii mas MALDI-TOF, a następnie genotypowano przy użyciu techniki ERIC-PCR. Technikę ta wykorzystano również do potwierdzania transferu genów oporności na antybiotyki (genotypowania otrzymanych traskoniugantów). Wrażliwość LAB na działanie antybiotyków oznaczano m.in. z wykorzystaniem systemu VITEK 2. Geny kodujące oporność na wybrane antybiotyki wykrywano przeprowadzając PCR, a ich ekspresję analizowano w oparciu o wyniki Real-Time PCR. Przeżywalność bakterii oznaczano natomiast metodą posiewów ilościowych oraz przy użyciu cytometru przepływowego. Wszystkie wymienione metody zostały opisane z należytą

staranności i właściwie użyte. Cała metodologia badań została także pozytywnie oceniona przez niezależnych recenzentów publikacji wchodzących wkład rozprawy doktorskiej.

W dysertacji szczególne miejsce zajmują badania nad transferem genów kodujących oporność na antybiotyki. Wart podkreślenia jest fakt, że badania te przeprowadzono nie tylko, jak to czyni większość badaczy, w warunkach *in vitro,* ale także *in situ*, tj. w mleku, do którego zakwaszana użyto wybrane kultury LAB (dawców i biorcy). To w pełni oryginalne podejście badacze pozwoliło na dokonanie wielu ważnych okryć. W tym miejscu ciekawi mnie – w jaki sposób ustalono warunki badań modelowych oceniających możliwość transferu genów oporności na antybiotyki? Czy temperatura oraz czas inkubacji mogą mieć wpływ na ten proces? Analogiczne pytanie nasuwa mi się w przypadku badań nad wpływem czynników stresowych na transfer genów odpowiedzialnych za antybiotykoodporność. Dlaczego inkubację oceniająca wpływ stresu osmotycznego i pH opisaną w publikacji P3 prowadzono innej temperaturze (30ºC) niż w badaniach będących przedmiotem publikacji P2, P4 i P5 (37 i 42ºC) oraz dodatkowo w warunkach beztlenowych? Ciekawi mnie również - dlaczego w poszczególnych eksperymentach analizie poddano różne pule dawców (inne szczepy) oraz czy rozważano użycie w pracy również większej puli szczepów - biorców?

Pierwszym etapem pracy badawczej doktorantki była izolacja szczepów LAB. Z tym wcale nie łatwym zadaniem doktorantka dała sobie radę, izolując łącznie 58 szczepów LAB z 30 komercyjnych kultur starterowych oraz 10 ochronnych. Szczepy te następnie zidentyfikowała oraz oceniła ich różnorodność genetyczną. Po zapoznaniu się wynikami tych badań, mam pytanie do doktorantki – czy wyniki identyfikacji zaskoczyły Panią? Czy skład badanych kultur był zgodny z deklaracjami ich producentów? Ciekawi mnie również jakie dokładnie kultury były przedmiotem Pani badań?

Zidentyfikowane szczepy mgr U. Zarzecka przebadała dalej m.in. pod kątem obecności genów kodujących oporność na wybrane antybiotyki. Badania te niestety potwierdziły przypuszczenia doktorantki i współpracujących z nią naukowców, dotyczące występowania w szczepionkach wykorzystywanych do produkcji żywności fermentowanej szczepów będących źródłem genów nabytej oporności na antybiotyki. Co więcej wykazały, że geny te mogą być przenoszone na drodze koniugacji do innych LAB. Ważnym odkryciem doktorantki, trochę łagodzącym obawy związane rozprzestrzenianiem się genów antybiotykoodporności było ustalenie, że częstość ich transferu w żywności była niższa od występującej w warunkach laboratoryjnych. Niemniej jednak kolejne badania dostarczyły już bardzo niepokojących danych. Z racji sentymentu jaki mam do LAB oraz uznania ich zasług, dane te szczerze mnie zasmuciły. Wykazały bowiem, że stresy generowane przez wzrost ciśnienia osmotycznego, zakwaszenie, przechowywanie chłodnicze oraz obróbkę wysokociśnieniową, a więc procesy z którymi możemy mieć do czynienia podczas produkcji żywności, zwiększają szybkość/częstość transferu genów kodujących oporność na antybiotyki. Kolejną dobrze udokumentowaną i bardzo wartościową obserwacją poczynioną przez doktorantkę było stwierdzenie, że ww. czynniki stresowe wpływają także na poziom ekspresji genów oporności na antybiotyki, a sposób i siła ich działania zależy od rodzaju i natężenia czynnika stresowego. Ciekawym wynikiem prezentowanym w publikacjach P3 i P4 było też ustalenie, że ekspozycja na wysokie ciśnienie zwiększa ekspresję genów kodujących oporność na tetracykliny, ampicylinę i chloramfenikol, natomiast obniża genów kodujących oporność na aminoglikozydy. Zmiany te znajdowały przy tym odzwierciedlenie w oznaczeniach wartości MIC.

Wyniki badań dysertacyjnych mgr U. Zarzecka poddała analizie w odniesieniu do dostępnej literatury. Z merytorycznego punktu widzenia dyskusja wyników została przeprowadzona poprawnie. Doktorantka nawiązała w niej do wyników badań innych autorów o podobnym charakterze, pokazując na ich tle swoje dokonania.

Podsumowaniem dysertacji są trzy trafne stwierdzenia oraz krótki dodatkowy komentarz. Podkreślono w nim potrzebę prowadzenia dalszych badań. Zaakcentowano też, że wykryta w pracy zdolność przenoszenia genów antybiotykoodporności u szczepów LAB budzi niepokój. Ciekawa jestem zdania doktorantki na temat związanych z tym realnych zagrożeń.

Reasumując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska w postaci cyklu pięciu publikacji naukowych jest w pełni oryginalnym opracowaniem o doskonale wybranej, aktualnej i godnej podjęcia tematyce. Wszystkie prace będące jej przedmiotem reprezentują wysoki pozom naukowy oraz mogą być przyczynkiem do stawiania dalszych hipotez i pytań badawczych. Najlepszym potwierdzeniem ich wartości jest fakt, że zostały opublikowane w czasopismach o uznanej renomie w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Praca doktorska mgr U. Zarzeckiej została wykonana z dużą starannością oraz zachowaniem właściwej metodologii badań biologicznych. Czytałam ją z przyjemnością oraz uznaniem dla jej Autorki. W moje ocenie w rozprawie doktorskiej mgr Urszuli Zarzeckiej na wyróżnienie zasługuje nie tylko sposób, ale i jakość wykonania badań. Bardzo wysoko oceniam zakres przeprowadzonych prac eksperymentalnych, wielokierunkowość podejść badawczych oraz ilość i rodzaj użytych technik analitycznych. Dzięki temu możliwe było kompleksowe spojrzenie na zagadnienia związane z możliwością przenoszenia/wymiany genów antybiotykoodporności pomiędzy LAB obecnymi w żywności. Oceniana rozprawa doktorska wraz ze składającymi się na nią publikacjami jest ponadto źródłem nowej wiedzy na temat wpływu czynników stresowych na antybiotykoodporność LAB oraz ryzyko jej przenoszenia. Poprzez to wnosi ona istotny wkład w badania zmierzające do wyjaśnienia odpowiedzi komórkowej bakterii na warunki stresowe. Unikalny materiał wynikowy zebrany w dysertacji wskazuje jednak przede wszystkim na potrzebę monitorowania antybiotykoodporności szczepów LAB wykorzystywanych do produkcji żywności nie tylko na poziomie fenotypowym, ale również genotypowym.

Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny doktorska pani mgr Urszuli Zarzeckiej pt. „Antybiotykoodporność drobnoustrojów wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych – możliwości horyzontalnego transferu genów oraz wpływ czynników środowiskowych na ekspresję oporności na antybiotyki”, **spełnia wymagania** zapisane w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U 2023, poz. 742 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o **dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów postępowania doktorskiego**.

Ponadto, z uwagi na wysoki poziom naukowy publikacji będących podstawą przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej, bardzo dobrze zaplanowaną strategię badawczą, kompleksową analizę tematu oraz wysoką wartość materiału wynikowego, zwracam się do Wysokiej Rady o **wyróżnienie rozprawy** doktorskiej pani mgr Urszuli Zarzeckiej stosowaną nagrodą.