SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO

Warszawa, 13.12.2023

Prof. dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Ocena rozprawy doktorskiej
pani mgr Urszuli Zarzeckiej
pt. „Antybiotykooporność drobnoustrojów wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych – możliwość horyzontalnego transferu genów oraz wpływ czynników środowiskowych na ekspresję oporności na antybiotyki"
wykonanej na Wydziale Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, w dziedzinie nauk rolniczych,
w dyscyplinie technologia żywności i żywienia,
pod kierunkiem
pani dr hab. inż. Anny Zadernowskiej, prof. UWM jako promotora
i pani dr inż. Wioletty Chajęckiej-Wierzchowskiej jako promotora pomocniczego**

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wydział Żywienia Człowieka

ul. Nowoursynowska 159 C
02–776 Warszawa
+48 22 59 370 04
dwnzck@sggw.edu.pl
www.sggw.pl

Podstawa recenzji

Recenzja została wykonana w związku z pismem Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia prof. dr hab. inż. Anny Iwaniak z dnia 27.06.2023.

Recenzja sporządzona została na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej.

1. Ocena rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska nosi tytuł „Antybiotykooporność drobnoustrojów wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych – możliwość horyzontalnego transferu genów oraz wpływ czynników środowiskowych na ekspresję

oporności na antybiotyki". Temat odpowiada treści badań omówionych w pracy doktorskiej.

Plazmidy oporne na antybiotyki mogą być przenoszone koniugatywnie do innych szczepów, gatunków, a nawet rodzajów, w tym potencjalnych patogenów ludzkich lub zwierzęcych. Rodzi to pytanie, czy może zachodzić wymiana genetyczna między drobnoustrojami pokarmowymi a ludzką mikroflorą jelitową lub patogenami. Lekarze coraz częściej zwracają uwagę na poważny problem antybiotykoodporności bakterii patogennych. Spośród bakterii kwasu mlekowego oporność na antybiotyki odnotowano w przypadku szczepów wyizolowanych z wieprzowiny i wołowiny, a zwłaszcza z przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. Wiele gatunków LAB, takich jak *L. rhamnosus, L.* casei, *L. paracasei*, wiele innych pałeczek kwasu mlekowego, pediokoków i leuconostoków jest samoistnie opornych na wankomycynę ze względu na specjalną strukturę ich prekursorów peptydoglikanu ściany komórkowej.

W świetle obecnych badań, istnieje potencjalne ryzyko poziomego transferu plazmidów koniugacyjnych i transpozonów zawierających geny oporności na antybiotyki. Ze względu na niewielką liczbę doniesień naukowych dotyczących tego zjawiska w przypadku bakterii fermentacji mlekowej wykorzystywanych jako kultury starterowe, wybór tematu uważam za w pełni uzasadniony.

Struktura pracy i ocena zastosowanego piśmiennictwa

Praca liczy 68 str. tekstu wraz ze spisem piśmiennictwa plus załączniki tj. pełne teksty publikacji wchodzących w skład pracy i oświadczenie współautorów (łącznie 148 stron).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Urszuli Zarzeckiej ma formę opracowania, omawiającego jednotematyczny cykl 5. publikacji, w którym pierwszym autorem jest Doktorantka, sumaryczny wskaźnik IF=25,521, a punktacja według MNiSW= 580 pkt. (zgodnie z roku opublikowania pracy). Udział procentowy Doktorantki w poszczególnych publikacjach jest znaczący i wynosi od 55 do 65%. Cykl publikacji składa się z jednego artykułu przeglądowego i czterech oryginalnych artykułów w czasopismach naukowych.

P1. Zarzecka U., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W. 2020. Starter cultures as a reservoir of antibiotic resistant microorganisms. LWT-Food Science and Technology, 127, 109424. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109424 (100 pkt. MEiN2020; IF2020 3,714, liczba cytowań – bez autocytowań - Web of Science - 18)

P2. Zarzecka U., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. 2022. Microorganisms from starter and protective cultures - Occurrence of antibiotic resistance and conjugal transfer of tet genes in vitro and during food fermentation. LWT–Food Science and Technology, 153, 112490. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112490 (100 pkt. MEiN2022; IF2022 4,006, liczba cytowań – bez autocytowań - Web of Science - 6)

P3. Zarzecka U., Chajęcka-Wierzchowska W., Zakrzewski A., Zadernowska A., Fraqueza M.J. 2022. High pressure processing, acidic and osmotic stress increased resistance to aminoglycosides and tetracyclines and the frequency of gene transfer among strains from commercial starter and protective cultures. Food Microbiology, 107, 104090. https://doi.org/10.1016/J.FM.2022.104090 (140 pkt. MEiN2022; IF2022 5,516, liczba cytowań – bez autocytowań - Web of Science - 3)

P4. Zarzecka U., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W., Adamski P. 2023. Effect of high pressure processing on changes in antibiotic resistance genes expression among strains from commercial starter cultures. Food Microbiology, 110, 104169. https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104169 (140 pkt. MEiN2023; IF2023 6,374, liczba cytowań – bez autocytowań - Web of Science - 1)

P5. Zarzecka U., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W., Adamski P. 2023. High-pressure processing effect on conjugal antibiotic resistance genes transfer in vitro and in the food matrix among strains from starter cultures. International Journal of Food Microbiology, 388, 110104. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110104 (100 pkt. MEiN2023; IF2023 5,911, liczba cytowań – bez autocytowań - Web of Science - 2).

Rozprawa składa się ze streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu z omówieniem zagadnień w świetle literatury, celu, zakresu i hipotez badawczych, materiałów i zastosowanych metod, wyników, dyskusji, stwierdzeń końcowych i podsumowania, piśmiennictwa i załączników. Zamieszczono też wykaz stosowanych skrótów, a także informację o aktywności naukowej i zestawienie dorobku naukowego. Taki układ pracy jest prawidłowy i pozwala na klarowne przedstawienie wykonanych badań. W załącznikach znajdują się kopie wszystkich publikacji stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej. Wszyscy współautorzy określili na czym polegał ich wkład w przygotowanie publikacji i wyrazili zgodę aby publikacje zostały wykorzystane w przewodzie doktorskim mgr Urszuli Zarzeckiej. Są także oświadczenia Doktorantki, z określeniem na czym polegał jej wkład w przygotowanie publikacji.

Zmieszczony w omówieniu pięciu publikacji wykaz literatury zawiera 97 pozycji najnowszego piśmiennictwa światowego. Należy jednak podkreślić, że szczegółowe i krytyczne przedstawienie zagadnień literaturowych znajduje się w publikacji P1, w której Doktorantka wykorzystała 50 pozycji najnowszego piśmiennictwa światowego. Oceniam pozytywnie zarówno ten przegląd literatury jak i dobór zastosowanego piśmiennictwa.

Cel pracy i hipotezy naukowe

Celem pracy była analiza występowania oporności na antybiotyki wśród szczepów wchodzących w skład komercyjnych kultur starterowych i ochronnych oraz ich zdolność do horyzontalnego transferu genów oporności. Analizie poddano także wpływ czynników stresowych związanych z produkcją i przechowywaniem żywności na zmiany w ekspresji genów kodujących oporność na antybiotyki, jak i częstość transferu genów.

Cel pracy został sformułowany konkretnie i merytorycznie poprawnie. Nie mam do niego zastrzeżeń.

Doktorantka sformułowała także hipotezy badawcze:

1. Drobnoustroje wchodzące w skład komercyjnych kultur starterowych i ochronnych mogą być nosicielami genów nabytej oporności na antybiotyki

2. Drobnoustroje te mogą wykazywać zdolność do horyzontalnego transferu genów i przez to brać udział w rozprzestrzenianiu oporności w środowisku

3. Czynniki stresowe związane z produkcją, przetwarzaniem i przechowywaniem żywności mogą prowadzić do zmian w fenotypie oporności na antybiotyki szczepów wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych, ekspresji genów oporności na antybiotyki i/lub częstości transferu genów oporności

Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do sformułowanych hipotez. Natomiast uważam, że hipoteza druga powinna zostać uzupełniona o kilka słów gdyż w obecnej formie, ze względu na sformułowanie „Drobnoustroje te…" stanowi w pewien sposób kontynuację hipotezy pierwszej. Proponuję następujące brzmienie: Drobnoustroje wchodzące w skład komercyjnych kultur starterowych i ochronnych mogą wykazywać zdolność do horyzontalnego transferu genów i przez to brać udział w rozprzestrzenianiu oporności w środowisku.

Ocena zastosowanych metod badawczych

Praca została przeprowadzona w dwóch głównych częściach. Pierwsza dotyczyła oceny występowania oporności na antybiotyki i zdolności do horyzontalnego transferu genów natomiast druga analizy wpływu czynników stresowych na poziom oporności i częstość horyzontalnego transferu genów.

Badania zostały przeprowadzone w 5 etapach przedstawionych jasno na schemacie. Były to:

1. Izolacja i identyfikacja szczepów z kultur starterowych i ochronnych.
2. Ocena występowania oporności na antybiotyki.
3. Analiza zdolności do horyzontalnego transferu genów.
4. Analiza wpływu czynników stresowych na poziom oporności na antybiotyki.
5. Analiza wpływu czynników stresowych na częstość horyzontalnego transferu genów.

Doktorantka zastosowała różnorodne, nowoczesne techniki mikrobiologiczne. Korzystała z aparatury wysokiej jakości, ale wykorzystywała także tradycyjne metody posiewów.

Szczepy (40) do analizy otrzymała z komercyjnych kultur starterowych (30) i ochronnych (10),, od producentów oferujących kultury do wykorzystania w przemyśle spożywczym. Liofilizowane kultury ożywiała na bulionie MRS, a następnie izolowała na podłożu agarowym MRS do uzyskania czystych szczepów. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie ekstrakcji genomowego i plazmidowego DNA. Po identyfikacji zduplikowane szczepy odrzuciła i do dalszych analiz wybrała po jednym szczepie danego gatunku od każdego producenta. Doktorantka przeprowadziła genotypowanie przy użyciu techniki ERIC-PCR, a profile ERIC-PCR analizowała za pomocą analizy skupień z wykorzystaniem oprogramowania BioNumerics .

Do określenia fenotypu oporności na antybiotyki Doktorantka zastosowała dwie metody oznaczania: za pomocą pasków gradientowych na podłożu agarowym Mueller-Hinton i przy użyciu systemu VITEK®2 Compact do oznaczania wrażliwości drobnoustrojów. Testy obecności genów oporności na antbiotyki przeprowadziła z wykorzystaniem reakcji PCR przy użyciu określonych starterów i warunków, a jako kontrole pozytywne zastosowała szczepy referencyjne *E. faecalis* ATCC® 29212, *E. faecalis* ATCC® 51299, *S. epidermidis* ATCC® 35984, *S. epidermidis* ATCC® 12228 i szczepy z kolekcji Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności dobrze scharakteryzowane pod kątem występowania genów oporności na antybiotyki.

Doktorantka przeprowadziła analizę transferu genów oporności in vitro i in situ. Zdolność do przenoszenia genów oporności na antybiotyki in vitro Doktorantka badała z wykorzystaniem metody filtrów membranowych, możliwość transferu genów in situ zbadała na modelu zakwaszonego mleka.

W części drugiej swoich badań Doktorantka dokonała analizy wpływu czynników stresowych na poziom oporności i częstość horyzontalnego transferu genów. Jako czynniki stresowe wybrała ekspozycję na niskie pH, zwiększenie stężenia NACL i wysokie ciśnienie. Analizę przeżywalności szczepów w odpowiedzi na czynniki stresowe przeprowadziła metodą cytometrii przepływowej i metodą płytkową. Po ekspozycji na czynniki stresowe Doktorantka przebadała zmiany w fenotypie oporności na antybiotyki (analizę zmian ekspresji genów oporności oraz wpływ czynników stresowych na częstość transferu genów oporności).

Uważam, ze metody badawcze zostały prawidłowo wybrane i dostosowane do przeprowadzonych badań. Są różnorodne i umożliwiły uzyskanie planowanych rezultatów.

Merytoryczna ocena omówienia wyników badań, dyskusji i wniosków

Wyniki badań zostały przedstawione przez Doktorantkę w kilku rozdziałach omówienia odnoszących się do: puli szczepów zakwalifikowanych do analizy, występowania oporności na antybiotyki wśród drobnoustrojów z kultur starterowych i ochronnych, zdolności bakterii fermentacji mlekowej do horyzontalnego transferu genów, przeżywalności w odpowiedzi na czynniki stresowe związane z przetwórstwem żywności, wpływu czynników stresowych na zmiany w fenotypie antybiotykoodporności i ekspresji genów oporności na antybiotyki, wpływu czynników stresowych na zmiany w częstości transferu genów oporności na antybiotyki. Dokładne omówienie wyników znajduje się w załączonych publikacjach P2, P3, P4 i P5. Artykuły zostały przygotowane bardzo starannie i opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Uważam, że zaprezentowanie wyników badań, zarówno w omówieniu jak i publikacjach, nie budzi zastrzeżeń.

Wyniki zostały także przedyskutowane przez Doktorantkę w rozdziale Dyskusja. Ten rozdział jest szczególnie istotny i świadczy o krytycznym podejściu do wykonanych badań, a także umiejętności analizy i syntezy. Doktorantka wskazała na różnice w wynikach badań otrzymanych w rezultacie swoich doświadczeń, w porównaniu z otrzymanymi przez innych autorów (np. dotyczących fenotypu oporności na antybiotyki). W dyskusji Doktorantka wskazała, że spośród wszystkich zidentyfikowanych genów oporności, największa różnorodność wystąpiła w przypadku genów oporności na tetracykliny, a ponieważ szczepy wykorzystywane przemysłowo są spożywane

w dużej liczbie, niepokojącym zjawiskiem jest stwierdzona zdolność drobnoustrojów wchodzących w skład kultur przemysłowych do horyzontalnego przekazywania nabytej oporności na antybiotyki. Autorka zasugerowała, że zdolność do przenoszenia genów jest cechą zależną od szczepu i może zależeć od wielu czynników środowiskowych, a nawet pojedyncze przypadki przeniesienia genu oporności na antybiotyki są zjawiskiem niepożądanym, gdyż przyczyniają się do rozprzestrzeniania oporności w środowisku.

Bardzo istotną częścią wyników i ich dyskusji jest przedstawienie badań dotyczących wpływu stresu związanego z żywnością na oporność na antybiotyki wśród bakterii fermentacji mlekowej. Jest to część nowatorska gdyż w piśmiennictwie jest niewiele tego rodzaju doświadczeń. Doktorantka wykazała, że w wyniku działania czynników stresowych związanych z przetwarzaniem żywności, może dochodzić do zmian w częstości transferu genów oporności na antybiotyki zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i bezpośrednio w produkcie. Oceniam tę część badań i ich omówienie bardzo wysoko.

Na podstawie wyników i ich dyskusji, Doktorantka sformułowała 3 spostrzeżenia. Są one logiczne i wynikają z przeprowadzonych badań. Nie wiem dlaczego nie nazwała ich wnioskami gdyż moim zdaniem są to wnioski. Merytorycznie odpowiadają na cel pracy i hipotezy badawcze.

Podsumowując tę część recenzji, stwierdzam, że Doktorantka wykazała się umiejętnością zebrania, opracowania, przedstawienia bardzo różnych wyników badań. Swój wywód prowadziła logicznie, klarownie, starając się formułować ostrożne wnioski. Wskazuje to na ogólną, szeroką wiedzę teoretyczną i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktoranta.

Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, otwierając drzwi do dalszych badań, które mają też praktyczne zastosowanie. Przedstawione w rozprawie wyniki udowodniły, że problem antybiotykooporności dotyczy szczepów niepatogennych, celowo dodawanych do żywności i od lat uznawanych za bezpieczne, co może budzić niepokój. Jest to szczególnie istotne ze względu na wykazaną zdolność przenoszenia genów oporności. Może to w istotny sposób przyczynić się do rozprzestrzeniania oporności na antybiotyki w środowisku. Poza tym uzyskane wyniki wskazują, że w czasie przetwarzania żywności może dochodzić do zwiększania poziomu ekspresji genów oporności na antybiotyki i/lub częstości transferu genów, a tym samym szybszego rozprzestrzeniania oporności w środowisku. Praktycznym aspektem, z punktu widzenia zdrowia publicznego, jest zwrócenie uwagi na to zagrożenie i ryzyko, że szczepy wprowadzane do żywności mogą stać się środowiskowym rezerwuarem genów oporności na antybiotyki.

Zauważone niedokładne sformułowania i pytania do Doktorantki

Pragnę podkreślić, że praca jest napisana bardzo dobrym językiem, w sposób klarowny i jednocześnie zwięzły. Mam w związku z tym niewiele uwag i jedno pytanie:

1. Uzupełnienie drugiej hipotezy o słowa „wchodzące w skład komercyjnych kultur starterowych i ochronnych" – wyjaśnienie w odpowiedniej części recenzji.
2. W kilku miejscach, głównie w rozdziale Dyskusja zauważyłam sformułowanie „odporność" (zamiast oporność) w odniesieniu do szczepów lub genów np. s. 52 „...odporne na zimno szczepy LAB..."; s. 55 „... rozprzestrzenianie się genów odporności...". Rozumiem, że była to nieuzasadniona ingerencja „sztucznej inteligencji".
3. Myślę, że dyskusja mogłaby zostać podzielona na dwie części: pierwsza, która dotyczy oceny występowania oporności na antybiotyki i zdolności do horyzontalnego transferu genów oraz druga odnosząca się do analizy wpływu czynników stresowych na poziom oporności i częstość horyzontalnego transferu genów.
4. Wnioski, a nie „spostrzeżenia" - wyjaśnienie w odpowiedniej części recenzji.
5. Pytanie: czy znane są Pani dowody na przenoszenie genów oporności w warunkach przewodu pokarmowego?

Informacja o pozostałym dorobku pani mgr Urszuli Zarzeckiej

Pani mgr inż. Urszula Zarzecka jest współautorką 9 wysoko punktowanych publikacji w czasopismach z wysokim IF, 11 rozdziałów w monografiach pokonferencyjnych 18 doniesień na konferencjach naukowych (w tym 5 międzynarodowych).

Doktorantka brała udział w 3 projektach, w tym w jednym była kierownikiem, wykonała 21 recenzji artkułów naukowych. Łączny IF wynosi 52,702, liczba punktów MEiN 1290, H-indeks 5.

Jest to naprawdę imponujący dorobek naukowy młodego pracownika.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Urszuli Zarzyckiej wnosi nowe elementy do dyscypliny technologia żywności i żywienia. Doktorantka postawiła przed sobą konkretne, bardzo ambitne zadania i konsekwentnie je wykonała. Praca ma duży aspekt poznawczy, a także aplikacyjny.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca pani mgr Urszuli Zarzyckiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023, poz. 742 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie pani mgr Urszuli Zarzyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Urszuli Zarzyckiej ze względu na jej wysoki poziom naukowy i możliwości aplikacji uzyskanych wyników w praktyce przemysłowej i dietetycznej.