Politechnika Łódzka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Łódź, dn. 21-11-2023r.

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Klewicka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Zarzeckiej
zatytułowanej
„Antybiotykooporność drobnoustrojów wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych – możliwość horyzontalnego transferu genów oraz wpływ czynników środowiskowych na ekspresję oporności na antybiotyki”,
wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Zadernowskiej, prof. UWM
oraz dr inż. Wioletty Chajęckiej-Wierzchowskiej
w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Dane o Kandydatce

Kandydatka do stopnia doktora jest osobą bardzo aktywną pod względem naukowym. W swoim dorobku ma 14 publikacji z czego 12 to prace z listy JCR, 1 w czasopiśmie branżowym i 1 w czasopiśmie o charakterze popularno-naukowym. Dodatkowo znajdujemy 11 rozdziałów w monografiach pokonferencyjnych. Pani mgr Urszula Zarzecka 18 razy prezentowała wyniki na konferencjach naukowych. W roku 2023 od lutego do marca Kandydatka odbyła staż naukowy w Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León.

Pani mgr Urszula Zarzecka była kierownikiem 1 projektu i wykonawcą 2 projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych (NCN i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Jej osiągniecia naukowe wyrażone wskaźnikami bibliometrycznymi są bardzo wysokie (IF=52,702, punkty ministerialne 1290, h-indeks 5,52 cytowania) biorąc pod uwagę fakt, że Kandydatka jest młodym naukowcem na początku kariery naukowej.

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
90-530 Łódź ul. Wólczańska 171/173, budynek A4
tel. 42 631-34-79, w5i53@adm.p.lodz.pl, binoz.p.lodz.pl
Adres do korespondencji:
90-924 Łódź ul. Żeromskiego 116

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Z przekazanych dokumentów wynika, że mgr Urszula Zarzecka wcześniej nie ubiegała się o stopień doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia ani w innej dyscyplinie.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny praca to cykl 5 publikacji o zasięgu międzynarodowym opublikowanych w latach 2020-2023 w czasopismach z listy JCR opatrzonych wspólnym tytułem „**Antybiotykooporność drobnoustrojów wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych – możliwość horyzontalnego transferu genów oraz wpływ czynników środowiskowych na ekspresję oporności na antybiotyki”.** Jedna praca jest praca o charakterze przeglądowym, natomiast pozostałe 4 są pracami eksperymentalnymi (oryginalnymi). Dodatkowo do cyklu publikacji dołączono komentarz w języku polskim zawierający wprowadzenie do tematyki, cel i zakres pracy, hipotezy badawcze, metodykę, wyniki, dyskusję i literaturę. Wszystkie prace wchodzące w skład dysertacji doktorskiej są wieloautorskie, a z oświadczeń współautorów wyłania sią zdecydowanie wiodący wkład koncepcyjny i wykonawczy Doktorantki. **Taki układ pracy jest typowy dla prezentacji cyklu publikacji i spełnia wymagania ustawowe dotyczące prezentacji osiągniecia w przewodzie doktorskim.**

Dobór i znaczenie tematyki

Zwiększająca się ilość morganizmów antybiotykoodpornych jest palącym problemem współczesnej mikrobiologii lekarskiej i epidemiologii ale również mikrobiologii żywności. Powszechnie stosowaną praktyką koncernów farmaceutycznych podczas opracowywania nowych chemioterapeutyków jest zazwyczaj modyfikacja strukturalna dostępnych na rynku antybiotyków. Jest to droga bezpieczna dla producenta, ponieważ nie ponosi on tak dużych nakładów finansowych jak przy opracowaniu i wdrożeniu zupełnie nowego związku o aktywności antybiotycznej. Co nie znaczy, że takich badań się nie prowadzi. Przykładem na to są badania z 2023 r. prowadzone w Cold Spring Harbor Laboratory przez zespół badaczy pod kierunkiem Profesora Johna E. Mosesa, którzy opracowali antybiotyk zwalczający wankomycynooporne szczepy *Enterococcus* spp., co ciekawe bakterie nie rozwijały oporności na nowy lek. Niemniej badania te są obecnie na etapie wstępnym.

Bakterie do przekazywania antybiotykoodporności wykorzystują gównie horyzontalny transfer genów, który obejmuje takie procesy jak: koniugacja, transdukcja czy transformacja. A biorąc pod uwagę średni czas generacji bakterii szacowany na około od kilku minut do kilku godzin nabywanie lekooporności przez mikroorganizmy jest bardzo dynamiczne. Ponadto dużym rezerwuarem genów antybiotykoopornosci są mikroorganizmy środowiskowe nie zawsze związane z mikrobiotą i patogenezą występującą u człowieka i zwierząt, a wprowadzane mogą być do ich organizmów np. z żywnością. Do takich mikroorganizmów zaliczymy drobnoustroje stosowane w przemyśle spożywczym i paszowym, gdzie wykorzystuje się mikroorganizmy

w postaci kultur starterowych i kultur ochronnych. Najczęściej jest to szeroko pojęta grupa bakterii kwasu mlekowego, ale nie tylko. Bakterie kwasu mlekowego pomimo statusu GRAS mogą być wektorem przenoszącym antybiotykooporność szczególnie jeśli posiadają ruchome elementy genetyczne takie jak plazmidy i transpozony. Podjęta w dysertacji tematyka oceny wpływu stresu środowiskowego na kultury bakterii starterowych i ochronnych jako czynnika wpływającego na transfer genów antybiotykooporności oraz ich ekspresję **jest jak najbardziej aktualna i wpisuje się w nurt badań prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Ponadto wnosi do wiedzy z zakresu tej dyscypliny nowe informacje dotyczące przedmiotu badań.**

Ocena merytoryczna pracy

Problem antybiotykooporności szczepów patogennych dla człowieka i zwierząt jest w literaturze szeroko opisany. Natomiast niewiele jest danych na temat przenoszenia tej cechy przez bakterie uznane za bezpieczne dla człowieka i posiadające status GRAS czyli bakterie kwasu mlekowego. Bakterie kwasu mlekowego stosowane do wytwarzania żywności oraz do jej konserwowania mają tzw. historię bezpiecznego stosowania i niewiele jest doniesień o ich chorobotwórczym potencjale, a gdy się to dzieje, zazwyczaj są to przypadki gdzie współistnieją również inne choroby lub układ immunologiczny człowieka jest osłabiony np. chemioterapią. Bezpieczna historia stosowania szczepów bakterii żywności spowodowała dopuszczenie ich do stosowania w produkcji żywności bez konieczności przeprowadzenia badań potwierdzających ich bezpieczeństwo. Kontrowersyjny obecnie może być fakt, że szczepy, którym w przeszłości przyznano status bezpiecznych nie muszą być regularnie sprawdzane pod kątem występowania nabytej oporności na antybiotyki. Zatem szczepy te mogą stać się rezerwuarami genów oporności i przyczyniać się do ich rozpowszechniania.

Wiadomo, że bakterie fermentacji mlekowej charakteryzują się naturalną opornością na antybiotyki np. szczepy (wg. klasyfikacji obowiązującej do 2020 roku) należące do rodzaju *Lactobacillus* spp. są oporne na wankomycynę. Nie jest to zjawisko niepokojące ponieważ naturalna antybiotykooporność jest zazwyczaj kodowana na elementach stałego genomu bakterii i nie podlega horyzontalnemu transferowi genów. Niemniej obecnie wiadomo, że bakterie kwasu mlekowego w procesie adaptacji środowiskowej zdolne są do pobierania ruchomych elementów genetycznych, które stwarzają ryzyko horyzontalnego przenoszenia antybiotykooporności. Oczywiście nie zawsze się tak dzieje.

- Prosiłabym o wyjaśnienie kiedy obecność plazmidu lub plazmidów u bakterii kwasu mlekowego nie będzie promowała przenoszenia antybiotykooporności.

Przystępując do badań Doktorantka postawiła 3 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 przechowywanie 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.

Do badań wykorzystano kultury starterowe i ochronne od wiodących producentów. Zatem badania przeprowadzono na szczepach, które faktycznie występują w środowisku żywności. Fakt ten zasługuje na podkreślenie i jest niezmiernie ważny z punktu widzenia zarówno producenta ale przede wszystkim konsumenta. Wszystkie szczepy poddano analizie genetycznej z użyciem różnych metod biologii molekularnych i potwierdzono ich przynależność do deklarowanych taksonów oraz scharakteryzowano ich fenotypowy profil antybiotykoodporności. U wszystkich wytypowanych do badań szczepów została zbadana obecność sześciu genów oporności na tetracyklinę, czterech kodujących białka chroniące rybosom – *tet*M, *tet*O, *tet*S i *tet*W oraz dwóch kodujących pompy efflux – *tet*K i *tet*L. Ponadto każdy ze szczepów był analizowany pod kątem obecności genów kodujących oporność na aminoglikozydy - *aac(6')-Ieaph(2'')-Ia*, *aph(3'')-IIIa*, *aph(2'')-Ic*, *aac(6')-Ii* and *ant(6')-Ia*, chloramfenikol - *cat*, β - laktamy – *bla*Z, *bla*TEM, *bla*OXA, *bla*SHV i *bla*CTX-M, glikopeptydy – *van*A i *van*B orazmakrolidy – *erm*A, *erm*B, *erm*C i *msr*A/B. Dodatkowo użyto specyficznej pary starterów do amplifikacji genu związanego z obecnością transpozonów koniugacyjnych Tn*916*/Tn*1545*.

Bardzo ciekawym i wnoszącym nowe informacje do nauki w dyscyplinie technologia żywności i żywienia jest eksperyment dotyczący możliwości horyzontalnego przenoszenia genów odpowiedzialnych za oporność na tetracyklinę. Wytypowano 5 dawców (bakterie kwasu mlekowego) posiadających geny oporności na tetracyklinę zlokalizowane na plazmidach oraz biorcę *Enterococcus faecalis* wolnego od plazmidów. Eksperyment przeprowadzono w dwóch środowiskach: w modelowym podłożu BHI oraz w mleku jako matrycy żywności. W wyniku eksperymentu stwierdzono, że w matrycy żywności częstość występowania transferu genów oporności jest średnio o jeden rząd logarytmiczny niższa niż w przypadku podłoża modelowego.

- Jak można wytłumaczyć ten fakt?
- Czy przeprowadzono analizę składu obu środowisk i wskazano różnice, które mogłyby mieć kluczowe znaczenie w ograniczaniu lub stymulowaniu horyzontalnego transferu genów?

Podczas produkcji żywności obecne w niej bakterie będą poddawane różnym zabiegom technologicznym. Doktorantka do badań nad wpływem procesów technologicznych wytypowała procesy temperaturowe (niska temperatura), zmiany ciśnienia osmotycznego oraz wysokie ciśnienie. Na tym etapie pracy również oceniono przeżywalność metodą płytkową, stan fizjologiczny z użyciem cystometrii przepływowej oraz profil fenotypowy i genotypowy antybiotykooporności badanych bakterii

mlekowych. Stwierdzono, że czynnikiem wpływającym w sposób decydujący na przeżywalność bakterii kwasu mlekowego było ciśnienie 400 MPa, gdzie zaobserwowano redukcję żywych komórek od 64 do 93%. Natomiast wysokie ciśnienie 400 MPa nie miało zasadniczo wpływu (obserwowana tendencja) na poziom antybiotykooporności wyrażonej jako wartość MIC. Natomiast bakterie poddane stresowi osmotycznemu, niskiemu pH oraz niskiej temperaturze reagowały w większości przypadków podwyższeniem stężenia MIC, przy wysokiej przeżywalności około 80 do 90%. Ponadto w badaniach stwierdzono, że niskie pH i ciśnienie osmotyczne wpływają na szybkość ekspresji genów antybiotykoodporności. Innym rodzajem stresu środowiskowego będzie obecność w środowisku wysokich ciśnień. Jest to coraz popularniejsza metoda utrwalania żywności w przemyśle spożywczym. I tutaj Doktorantka wykazała, że technika wysokich ciśnień wpływa na ekspresję genów antybiotykoodporności co ma swoje odzwierciedlenie w profilu fenotypowym tej cechy. Dodatkowo w matrycy jaką jest żywność cecha ta może być intensyfikowana lub osłabiana.

Praca została bardzo starannie zaplanowana i konsekwentnie realizowana. Prezentacja wyników i dokumentacja jest rzetelna i nie budzi żadnych wątpliwości. Założony cel pracy został zrealizowany, postawione hipotezy badawcze pozytywnie zweryfikowane.

Wniosek o wyróżnienie

Stwierdzam, że podjęta w dysertacji tematyka i zaproponowane badania w układzie modelowym ale również dotyczące środowiska żywności są nowatorskie, wnoszą do dyscypliny technologia żywności i żywienia nowe informacje i z pewnością będą inspiracją dla innych badaczy do rozwijania tego kierunku badań. Ponadto dysertacja została przygotowana jako cykl publikacji opublikowanych bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym z listy JCR. Wykorzystane metody badawcze - klasyczne jak i najnowszej generacji wymagały od doktorantki dużej wiedzy teoretycznej jak i praktycznej oraz pokazują jak doskonałym warsztatem posługuje się Kandydatka do stopnia doktora.

W związku z powyższymi przesłankami wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o wyróżnienie przedłożonej przez Panią mgr Urszulę Zarzecką rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Antybiotykooporność drobnoustrojów wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych – możliwość horyzontalnego transferu genów oraz wpływ czynników środowiskowych na ekspresję oporności na antybiotyki".

Wniosek końcowy

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska zatytułowana **„Antybiotykooporność drobnoustrojów wchodzących w skład kultur starterowych i ochronnych – możliwość horyzontalnego transferu**

genów oraz wpływ czynników środowiskowych na ekspresję oporności na antybiotyki” spełnia wymagania określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2023, poz. 742 z późn. zm). Założone cele badawcze zostały zrealizowane, a postawione hipotezy pozytywnie zweryfikowane. Przedstawione w pracy wyniki wpisują się nurt zagadnień badawczych prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

W oparciu o powyższe przesłanki wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie **o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Zarzeckiej i dopuszczenie Jej do dalszych etapów postępowania.**

