Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii

Centrum Dydaktyczno-Badawcze Nanotechnologii
Al. Piastów 45
70 – 311 Szczecin

tel. (091) 449 67 14
e-mail: karol.fijalkowski@zut.edu.pl

Prof. dr hab. inż. Karol Fijałkowski

Szczecin, dn. 21/06/2024

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego
pt. „Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów gotowych do spożycia z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii z rodzaju *Listeria* sp.”
wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa, Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod opieką naukową dr hab. inż. Anny Zadernowskiej, prof. UWM
oraz dr inż. Wioletty Chajęckiej-Wierzchowskiej

Podstawą wykonania niniejszej recenzji była Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia nr 9/2024, z dnia 5 kwietnia 2024 roku w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej mgr. inż. Arkadiusza Zakrzewskiego we wszczętym postępowaniu doktorskim w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Podstawę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej stanowi cykl pięciu, powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach 2020-2023, z których jeden jest pracą przeglądową, a cztery pozostałe publikacjami o charakterze eksperymentalnym:

Zakrzewski A., Gajewska J., Chajęcka-Wierzchowska W., Załuski D. Zadernowska A. (2023). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. Science of The Total Environment, 907, 167912.

Zakrzewski A. J., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Podlasz P. (2020). Virulence characterization of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri* isolated from fish and shrimp using *in vivo* early zebrafish larvae models and molecular study. Pathogens, 9(12), 1028.

Zakrzewski A. J., Kurpas M., Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W., Fraqueza M. J. (2023). A comprehensive virulence and resistance characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from fish and the fish industry environment. International Journal of Molecular Sciences, 24(4), 3581.

Zakrzewski A. J., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. (2022). Ceviche - natural preservative: possibility of microbiota survival and effect on *L. monocytogenes*. Foods, 11(6), 860.

Zakrzewski A., Gajewska J., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A. (2023). Effect of sous vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*. NFS Journal, 31, 155–161.

Liczba punktów Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za publikacje składające się na rozprawę doktorską wynosi 680, natomiast Impact Factor (IF) 24,76. Wszystkie artykuły stanowiące rozprawę doktorską opublikowane zostały w czasopismach reprezentujących wysoki poziom naukowy. Czasopisma te zaklasyfikowane są do dziedziny nauk rolniczych oraz dyscypliny naukowej technologia żywności i żywienia.

Badania eksperymentalne wchodzące w skład recenzowanej pracy zostały wykonane przez Doktoranta w ramach kilku projektów naukowych, wymienionych zarówno w części opisowej rozprawy doktorskiej (Informacja o finansowaniu badań), jak i w poszczególnych publikacjach naukowych. Projekty te finansowane były przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach konkursu Diamentowy Grant oraz przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursów PRELUDIUM 20 i OPUS 15. W przypadku Diamentowego Grantu i Preludium doktorant pełnił funkcję kierownika projektu, natomiast w grancie Opus był wykonawcą. Funkcję kierownika projektu Opus 15 pełniła Pani prof. Anna Zadernowska, a więc promotor przestawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. W tym miejscu chciałbym podkreślić umiejętności Doktoranta nie tylko w realizowaniu badań jako członka zespołów badawczych, ale również w pozyskiwaniu środków na ich realizację.

Zgodnie z informacjami zawartymi w rozprawie doktorskiej, Pan mgr inż. Arkadiusz Zakrzewski prowadził swoje badania we współpracy z naukowcami z różnych Wydziałów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie oraz z innych uczelni polskich i zagranicznych, w tym z Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, Uniwersytetu w Lizbonie oraz Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Wiedniu. Dlatego w tym zakresie, chciałbym docenić umiejętności Doktoranta w prowadzeniu badań i przygotowywaniu publikacji naukowych we współpracy z innymi naukowcami.

Dobór problematyki badawczej i tematu rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest ciekawą pracą przedstawiającą, w sposób kompleksowy i szczegółowy zagadnienia związane z wpływem obróbki gastronomicznej (związanej z metodą sous vide oraz przygotowaniem ceviche) na zmiany w potencjale chorobotwórczym, a także profilu antybiotykooporności pałeczek z rodzaju *Listeria*. Warto podkreślić, że badania związane z wirulencją analizowanych szczepów Doktorant wykonywał zarówno na poziomie genetycznym jak i na modelu żywym z wykorzystaniem zarodków *Danio rerio* oraz larw *Galleria mellonella*. Ponadto, Autor, odchodząc nieznacznie od głównego nurtu badawczego związanego z tematyką swojej pracy doktorskiej, podjął się trudu przeprowadzenia analiz związanych z występowaniem bakterii z rodzaju *Listeria* (w szczególności *L. monocytogenes*) w rybach surowych, produktach z ryb oraz środowisku przetwórczym ryb. W mojej opinii wybór tematu recenzowanej rozprawy należy uznać za trafny i dotyczący aktualnego, niedostatecznie zbadanego zagadnienia, a ponadto w znacznym stopniu wychodzącego naprzeciw oczekiwaniom praktyki, w zakresie zarówno profesjonalnego jak i domowego

przetwórstwa żywności oraz ściśle związanego z nim bezpieczeństwa mikrobiologicznego otrzymywanych produktów spożywczych.

W dobie powszechnej dostępności do informacji oraz różnego rodzaju tradycyjnych jak i nowatorskich narzędzi i urządzeń gastronomicznych, a także rozwiązań technologicznych, eksperymentowanie z tradycyjnymi jak i zupełnie nowymi przepisami i technikami kulinarnymi nieustannie zyskują na popularności. Z podobnych powodów, można zauważyć również, że coraz więcej osób, niezwiązanych profesjonalnie z gastronomią, odkrywa przyjemność z gotowania w domu, traktując to nie tylko jako sposób na przygotowanie posiłków, ale również jako hobby czy formę relaksu. W kontekście ciekawych rozwiązań technologicznych, dostępnych zarówno dla profesjonalnych kucharzy jak i pasjonatów kulinarnych, szczególną uwagę zwraca metoda sous vide. Jest to technika przyrządzania mięs, ryb oraz innych produktów spożywczych w zamkniętych wcześniej woreczkach próżniowych, w kontrolowanej temperaturze (poniżej 100°C, a w przypadku ryb często poniżej 60°C) i czasie (zazwyczaj nie dłuższym niż kilka godzin, a w przypadku ryb nawet poniżej 1 godziny). Z kolei, w kontekście ciekawych i zyskujących na popularności, stosunkowo prostych, a także nie wymagających technologicznego wsparcia pomysłów na urozmaicenie menu rybnego, można wymienić egzotyczną potrawę ceviche, przygotowywaną na bazie świeżych surowych ryb oraz soku z cytrusów. Pod względem technologicznym, a w szczególności biorąc pod uwagę aspekty związane z mikrobiologicznym bezpieczeństwem żywności zauważyć można, że elementem łączącym przygotowanie potraw (w szczególności ryb) techniką sous vide jak i zgodnie z recepturą ceviche może być brak czynników zapewniających efektywne niszczenie obecnych w surowych produktach mikroorganizmów, w tym przede wszystkim bakterii patogennych. Warto zwrócić uwagę, że ryby i owoce morza są jednymi z najszybciej psujących się produktów spożywczych, a tym samym stanowią bardzo dobre środowisko do rozwoju bakterii, w tym chorobotwórczych bakterii z rodzaju *Listeria*. Bakterie te, a w szczególności gatunek *L. monocytogenes*, są czynnikiem etiologicznym listeriozy, choroby, która może mieć szczególnie groźny przebieg u noworodków, osób starszych, kobiet w ciąży i osób z osłabionym układem odpornościowym. Potencjał patogenny bakterii z rodzaju *Listeria* wiąże się z licznymi toksynami wytwarzanymi przez te drobnoustroje, a także z ich zdolnością do infekowania różnych typów komórek i przekraczania barier obronnych organizmu, w tym barier jelitowych, krew-mózg i łożyskowych. Dlatego, chociaż zakażenia pałeczkami *Listeria* nie należą do najczęstszych, w porównaniu z innymi patogenami przenoszonymi przez żywność, to jednak charakteryzują się bardzo dużą śmiertelnością. W nawiązaniu do wcześniej wspomnianej, potencjalnie niewystarczająco efektywnej pod względem działania przeciwdrobnoustrojowego obróbki ryb techniką sous vide i procesu przygotowywania ceviche, warto zwrócić uwagę na konsekwencje jakie niesie za sobą tego typu oddziaływanie na komórki drobnoustrojów. Podobnie jak w mikrobiologii klinicznej, nieefektywne stężenia antybiotyków, tak w mikrobiologii żywności nieodpowiednio dostosowana technologia przetwarzania surowców i produktów spożywczych, może nie tylko umożliwić przeżycie drobnoustrojom chorobotwórczym, ale również doprowadzić do uruchomienia u nich procesów zaangażowanych w odpowiedź na stres komórkowy, a w konsekwencji do niekorzystnych z punktu widzenia pacjenta lub konsumenta zmian w ich patogenności oraz antybiotykooporności.

Reasumując, zagadnienia których dotyczy recenzowana rozprawa doktorska są ważne i ciekawe oraz wpisują się w tematykę nurtu badań związanych z bezpieczeństwem mikrobiologicznym produktów gotowych do spożycia, w tym przede wszystkim w kontekście potencjalnych zagrożeń związanych z obecnością patogennych bakterii z rodzaju *Listeria*.

Uwagi i komentarze

W mojej opinii, temat rozprawy doktorskiej mógłby zostać poszerzony o aspekty związane z zagadnieniami prezentowanymi w 3 pierwszych publikacjach włączonych przez Autora do cyklu prac. W obecnej formie, temat nawiązuje przede wszystkim do dwóch ostatnich prac cyklu. W tym kontekście, należałoby również bardziej podkreślić jaki jest związek i znacznie prac P1, P2 i P3 dla realizowanej pracy doktorskiej, w szczególności biorąc pod uwagę jej temat oraz zakres zaplanowanych do realizacji badań.

Ocena formalno-redakcyjna pracy

Praca doktorska Pana mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego, wliczając artykuły naukowe i oświadczenia współautorów liczy 154 strony. Układ pracy oraz kolejność rozdziałów są poprawne i typowe (poza jednym wyjątkiem opisanym poniżej) dla dysertacji doktorskich opartych na cyklu spójnych tematycznie publikacjach naukowych. Załączone kopie publikacji stanowiące zasadniczą część rozprawy doktorskiej poprzedzone zostały krótkim opisem (tzw. autoreferatem). Rozprawę doktorską rozpoczyna informacja o projektach, w ramach których finansowane były badania, spis publikacji stanowiących rozprawę doktorską, a także wykaz pozostałego dorobku naukowego. W dalszej kolejności Doktorant zamieścił wykaz skrótów, a także streszczenie w języku polskim i angielskim. Zasadnicza część dysertacji podzielona została na rozdziały uzasadniające przeprowadzone badania, prezentujące sformułowane hipotezy i cele, opisujące stosowane materiały i wykorzystywane metody oraz uzyskane wyniki, a także podsumowujące najważniejsze osiągnięcia z poszczególnych analiz, w tym w postaci wniosków. Całość opatrzona została spisem cytowanej literatury. Na ostatnią część pracy składają się załączniki zawierające oświadczenia współautorów poszczególnych publikacji oraz kopie publikacji stanowiących rozprawę doktorską.

Oceniając pracę pod względem redakcyjnym uważam, że zasadniczo jest ona napisana jasnym, zrozumiałym i w większości poprawnym językiem. Informacje teoretyczne (w przypadku artykułu przeglądowego), jak i wyniki (w przypadku prac eksperymentalnych) przedstawione w tabelach, wykresach i diagramach poszczególnych publikacji włączonych do cyklu stanowiącego rozprawę doktorską są czytelne i logiczne.

We wszystkich publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Pan mgr inż. Arkadiusz Zakrzewski jest pierwszym autorem, co świadczy o jego wiodącej roli w przeprowadzanych eksperymentach. Wkład Doktoranta w przygotowanie artykułów naukowych o charakterze przeglądowym i doświadczalnym polegał na jego współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Wkład Doktoranta, jak i poszczególnych autorów prac opisany w oświadczeniach współautorów jest zgodny z informacjami przedstawionymi w publikacjach naukowych (rozdziały „Authors' contributions”). W mojej opinii zaangażowanie Doktoranta w przeprowadzenie eksperymentów i przygotowanie publikacji stanowiących rozprawę doktorską jest odpowiednie i pomimo kilkuosobowego zespołu autorów poszczególnych prac z łatwością można wyodrębnić jego udział w każdym z artykułów.

Na podkreślenie zasługuje również imponujący, pozostały dorobek naukowy Doktoranta, na który składa się m.in. 19 publikacji naukowych opublikowanych w większości (17 prac), w czasopismach z wysokim IF (w czterech z tych publikacji, Doktorant jest pierwszym autorem). Ponadto Doktorant jest autorem kilkunastu rozdziałów w monografiach oraz kilkudziesięciu

doniesień konferencyjnych. W trakcie wykonywania pracy doktorskiej, Doktorant brał również udział w siedmiu projektach badawczych oraz odbył pięć staży naukowych na uniwersytetach w Austrii, Finlandii, Portugalii, Belgii i Gdańsku. W sumie, na zagranicznych stażach naukowych Doktorant spędził ponad 330 dni.

Uwagi i komentarze

Niektóre fragmenty części opisowej doktoratu napisane zostały w sposób zbyt ogólny, a dodatkowo zdarza się, że zawierają również nadmiar informacji, co powoduje, że są one trudne do zrozumienia lub stają się zrozumiałe dopiero po uzupełnieniu i usystematyzowaniu wiedzy z załączonych manuskryptów publikacji.
Na przykład w zdaniu „W części eksperymentalnej zastosowano unikalną kombinację metod, po raz pierwszy zbadano możliwość przetrwania procesów gastronomicznych przy pomocy cytometrii przepływowej, charakteryzującej się znacznie większa dokładnością niż metody tradycyjne." – możliwość przetrwania powinna zostać doprecyzowana, np. o drobnoustroje, lub konkretny rodzaj czy gatunek.
Z kolei, w zdaniu „Dodatkowo analizowano cały genom nowoczesnymi technikami sekwencjonowania, potencjał chorobotwórczy oraz wpływ obróbki sous vide i przygotowania ceviche na pałeczki *L. monocytogenes* nie tylko *in vitro*, ale również w modelu żywym." – w jednym zdaniu podanych jest tak dużo informacji, że trudno jest zrozumieć i w pełni docenić złożoność opisywanego etapu badawczego.
W kolejnym przykładzie, „Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej potwierdziły, że zarówno *Listeria* sp. oraz *L. monocytogenes* częściej występują w gotowych do spożycia produktach z ryb niż w surowcach." – Autor powinien doprecyzować jakie surowce ma na myśli.
Podobnie w zdaniu „Analiza przeżywalności szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z ryb i ze środowiska produkcyjnego podczas przygotowania ceviche oraz podczas obróbki sous vide." – środowisko produkcyjne powinno zostać doprecyzowane.
Autorowi zdarza się również niewłaściwe wykorzystanie słownictwa, np. larwy barciaka nie mogły zostać zainfekowane roztworem NaCl, ponieważ substancja ta nie jest czynnikiem infekcyjnym („Grupę kontrolną stanowiły larwy *G. mellonella* zainfekowane 0,9% roztworem NaCl.").

Autor nie umieścił tabel i wykresów w części opisowej doktoratu, co niestety zmusza czytelnika do każdorazowego odnajdowania ich w załączonych publikacjach.

Chociaż cel główny nawiązuje do tematu pracy doktorskiej, to jednak nie obejmuje wszystkich jej wątków badawczych. Z kolei dwa pierwsze cele szczegółowe mają wprawdzie ścisły związek z dwoma pierwszymi publikacjami cyklu, ale już znacznie mniejszy, z tematem pracy doktorskiej oraz z celem głównym.

Rozdział Materiały i metody rozpoczyna się dość nietypowo, od opisu metod.

Dla lepszego zrozumienia pracy, warto zadbać o ujednolicenie nazw używanych do opisu wykorzystywanych w badaniach materiałów lub miejsc, z których te materiały (w tym, wykorzystywane szczepy bakterii) otrzymano. W pracy naukowej, nazewnictwo powinno być jednoznaczne, a stosowanie synonimów może być mylące.

Chociaż analizy z wykorzystaniem larw barciaka prowadzone były w ramach badań do dwóch publikacji (biorąc pod uwagę temat i cel pracy doktorskiej, były to najważniejsze publikacje), to Autor nie uwzględnił ich w etapach badań prezentowanych na rysunku 1 (w zasadzie etap analiz związanych z patogennością nie został w ogóle uwzględniony).

Formułowanie aż pięciu wniosków na podstawie wyników pracy przeglądowej jest w moim odczuciu nieuzasadnione, tym bardziej, że większość z nich nie ma ścisłego powiązania z tematem rozprawy.

Cześć wniosków sformułowanych przez Autora ma zbyt ogólny charakter. Wprawdzie wnioski powinny charakteryzować się pewnym stopniem uogólnienia, ale z drugiej strony muszą one przekazywać informacje w sposób na tyle konkretny, żeby możliwe było jednoznaczne zrozumienie najważniejszych osiągnięć wynikających z przeprowadzonych doświadczeń. Jako przykład, we wniosku nr 8., określenia, takie jak „wiele genów", „najczęściej wykazują", „najistotniejsze antybiotyki", nie pozwalają ani w pełni zrozumieć, ani docenić, ani wykorzystać podawanych przez Autora informacji.

Ocena merytoryczna pracy

Praca doktorska Pana mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego to obszerny i dobrze wykonany eksperyment naukowy z wykorzystaniem bardzo szerokiego wachlarza metod z zakresu mikrobiologii klasycznej jak i biologii molekularnej, w tym zaawansowanych technik bioinformatycznych, sekwencjonowania oraz cytometrycznych. Zastosowane metody zostały w większości właściwie dobrane do realizacji założonych celów badawczych. W mojej opinii, metodyczne zróżnicowanie wykonanych badań naukowych oraz ich prawidłowe dostosowanie do postawionego celu badawczego świadczy o profesjonalnym i wszechstronnym przygotowaniu Autora do samodzielnego wykonywania części doświadczalnej pracy.

W pierwszym etapie swoich badań Doktorant przeprowadził analizę blisko 600 publikacji naukowych pod kątem określenia występowania bakterii z rodzaju *Listeria* oraz gatunku *L. monocytogenes* w rybach, produktach z ryb i środowisku przetwórczym. Następnie dokładnie scharakteryzował siedemnaście szczepów *L. monocytogenes*, z wykorzystaniem m.in. analizy MLST, dokonał oceny ich rezystomu oraz wirulomu, w tym obecności wysp patogenności oraz kilkudziesięciu innych genów związanych z wirulencją. Ponadto, Autor wykonał również bardzo ciekawe i dostarczające ważnych informacji, a przy tym ciągle dość rzadko stosowane w badaniach mikrobiologicznych, doświadczenia pozwalające mu na ocenę potencjału patogennego szczepów *L. monocytogenes, L. innocua* i *L. welshimeri* z wykorzystaniem zarodków *Danio rerio* oraz larw *Galleria mellonella*. Doktorant dokonał także oceny zmian w żywotności, profilu anybiotykooporności oraz potencjału chorobotwórczości pałeczek *L. monocytogenes* zachodzących w wyniku obróbki gastronomicznej. Badania z tego zakresu wykonane zostały z zastosowaniem metod cytometrycznych (zmiany w żywotności), genetycznych (zmiany w ekspresji genów powiązanych z opornością) oraz fenotypowych (zmiany w wartościach MIC), a także z wykorzystaniem wcześniej wspomnianych larw *G. mellonella*.

W wyniku przeprowadzonych badań i analiz Doktorant potwierdził, że ryby i owoce morza oraz środowisko przetwórcze są istotnym źródłem bakterii z rodzaju *Listeria* w tym przede wszystkim *L. monocytogenes*. Dowiódł także, że istnieje duża heterogeniczność fenotypowa i genetyczna szczepów izolowanych z ryb, produktów gotowych do spożycia z ryb oraz ze środowiska przetwórstwa ryb. Jak ustalił Doktorant, szczepy izolowane z surowców i produktów z ryb są zbliżone genetycznie do szczepów izolowanych od pacjentów chorujących na listeriozę. Ważnym osiągnięciem przeprowadzonych prac badawczych było udowodnienie, że wszystkie badane przez Doktoranta szczepy posiadały wyspy patogeniczności listerii-1 (LIPI-1) niosące geny, które są kluczowe dla przeżycia i wzrostu wewnątrz zainfekowanych komórek, a także do dalszego rozprzestrzeniania się tych bakterii. W dalszych badaniach, Autor wykazał, że spośród uwzględnionych w doświadczeniu drobnoustrojów, bakterie należące do gatunku *L. monocytogenes* charakteryzują się największym stopniem wirulencji, odpowiadając za największą śmiertelność zainfekowanych zarodków Danio. Doktorant udowodnił, że przygotowanie dań z ryb metodą sous vide lub zgodnie z przepisem na ceviche, które zanieczyszczone są pałeczkami *L. monocytogenes*, jest niewystarczającą obróbką, aby zapewnić ich bezpieczeństwo mikrobiologiczne. Przy czym jak również ustalił Doktorant, efekt mikrobiologiczny obróbki gastronomicznej powiązany jest ściśle z charakterystyką szczepu bakteryjnego. Autor wykazał również, że poza jednym szczepem *L. monocytogenes*, wszystkie pozostałe stały się mniej wirulentne po procesie przygotowywania ceviche. Z kolei, stres termiczny wywołany zastosowaniem obróki sous vide, skutkował obniżeniem się potencjału wirulencji u wszystkich analizowanych przez Autora szczepy bakterii. Doktorant zaobserwował również, że w kontekście zmian w profilu antybiotykooporności większe znaczenie, w porównaniu do stresu wywołanego przygotowaniem ceviche, ma stres termiczny. W tym wypadku Autor najistotniejsze zwiększenie wartości MIC odnotował dla tetracykliny, lewofloksacyny i daptomycyny, natomiast zmniejszenie wartości MIC dla nitrofurantoiny i chloramfenikolu.

Podsumowując, uzyskane przez Doktoranta wyniki są cenne i dostarczają ważnych informacji o znaczeniu nie tylko poznawczym, ale również praktycznym. Z całą pewnością wyniki jakie uzyskał i zaprezentował Doktorant poszerzyły wiedzę na temat potencjału chorobotwórczego i profilu antybiotykooporności bakterii z rodzaju *Listera* wyizolowanych z ryb, produktów gotowych do spożycia z ryb oraz ze środowiska przetwórstwa ryb.

Uwagi, komentarze i pytania do dyskusji w trakcie obrony pracy doktorskiej:

Doktorant powinien bardziej zaakcentować aspekt związany z nowatorskością prowadzonych badań. Nowatorski charakter prowadzonych prac badawczych Doktorant wyraża przede wszystkim poprzez stosowanie nowoczesnych metod, np. cytometrii przepływowej oraz analiz związanych z wirulencją, które prowadzone były *in vivo*. Natomiast, w kontekście wymienionych, nowoczesnych metod badawczych, szczególnie w opisie wyników, warto byłoby podkreślić jaka jest ich wartość dodana w porównaniu do wyników, które uzyskane byłyby metodami bardziej klasycznymi. Z drugiej strony, uważam, że chociaż cytometria przepływowa jest techniką charakteryzującą się dużą czułością, to w badaniach mikrobiologicznych, ze względu na rozmiar komórek bakteryjnych, jest dość problematyczna (szczególnie w przypadku, kiedy do znakowania komórek nie są stosowane przeciwciała, a jedynie niespecyficzne barwniki). Z tego

względu Doktorant, przynajmniej część badań powinien wykonać z wykorzystaniem mniej czułych, ale bardziej bezpośrednich metod, np. opartych o klasyczny pomiar liczby CFU.

Nawiązując do dwóch ostatnich hipotez sformułowanych przez Autora, w których założono, że przygotowanie ceviche oraz dań z ryb metodą sous vide przy wysokim poziomie zanieczyszczenia pałeczkami *L. monocytogenes*, może być niewystarczającą obróbką, aby zapewnić ich bezpieczeństwo mikrobiologiczne, chciałbym zapytać czy istnieją badania, w których inni autorzy wyciągnęli odmienne wnioski, tzn. wykazali, że obróbka taka jest wystarczająco efektywna. Proszę również o doprecyzowanie, jak należy rozumieć wysoki poziom zanieczyszczenia i czy, można przyjąć, że przy mniejszej liczebności bakterii warunki obróbki zastosowane w pracy doktorskiej byłaby skuteczne?

W jakim okresie wyizolowane zostały wykorzystane przez doktoranta szczepy bakterii? W różnych okresach izolaty bakterii cechują się określonym profilem antybiotykooporności i wirulencji. Dlatego uwzględnienie w pracy tego typu informacji, szczególnie w przypadku analiz związanych z antybiotykoopornoscią i potencjałem patogennym, byłyby wartościowe dla lepszego wykorzystania prezentowanych wyników.

W opisie wykorzystywanych bakterii autor zaznacza, że wykorzystywane przez niego szczepy pochodziły „z surowców, w tym łosia surowego (*Salmo salar*)" – zakładam, że autor miał na myśli łososia atlantyckeigo, pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), krewetek tygrysich (*Penaeus monodon*) oraz z zakładów przetwórstwa ryb – przy czym Autor nie podaje informacji, jak należy rozumieć ostatnie miejsce pochodzenia bakterii. W tym wypadku nie można wykluczyć, że były to również ryby, znajdujące się we wspomnianych zakładach przetwórstwa.

W jakim celu szczepy, które stanowią kolekcję katedralną były przez autora identyfikowane ponownie?

Czy w różnych pracach wykorzystywano te same szczepy *Listeria*, czy za każdym razem były to inne bakterie?

Dlaczego do przygotowania minimalnego medium z mięsa ryb lub ceviche, wykorzystano filety z ryby Mahi-Mahi, a nie łososia, z którego m.in. wyizolowano wykorzystywane szczepy oraz jak należy rozumieć informację, że wykorzystane ryby były świeże?

Podana przez Autora receptura przygotowania ceviche jest bardzo dokładna, jak na przepis kulinarny. Proszę o wyjaśnienie czy wykorzystywane składniki muszą być łączone ze sobą aż w tak ściśle określonych proporcjach (co do setnych grama)?

Autor stwierdził, że częstotliwość występowania *L. monocytogenes* oraz *Listera* spp. zależy od gatunku ryby. Z drugiej strony stwierdził, że występowanie tych bakterii zależy również od rodzaju badanego materiału, w tym czy są to ryby, próby z przetwórstwa ryb lub produkty gotowe do spożycia. Proszę o wyjaśnienie czy wyniki uzyskane dla prób z przetwórstwa lub produktów gotowych można powiązać z gatunkami ryb, np. czy produkty gotowe do spożycia są

przygotowywane najczęściej z wykorzystaniem gatunków ryb bardziej podatnych na zanieczyszczenia mikrobiologiczne.

Proszę o wyjaśnienie z czego mogą wynikać stwierdzone przez Autora różnice pomiędzy częstością izolacji *L. monocytogenes* z surowych ryb i gotowych do spożycia produktów w Europie oraz z czego mogą wynikać duże różnice w częstości występowania *L. monocytogenes* w różnych krajach.

Wykorzystanie ryb (*Danio rerio*) w tego typu badaniach wydaje się uzasadnione, natomiast chciałbym zapytać się czy Autor brał pod uwagę jakieś kryteria (np. fizjologiczne lub związane z układem odpornościowym), które uzasadniały wybór larw barciaka, jako drugiego organizmu do badań *in vivo*. Czy po zmianie modelu badawczego z Danio na barciaka, Autor obserwował różnice w uzyskiwanych wynikach, które mogłyby zmienić kwalifikację badanych szczepów bakterii pod względem ich patogenności? Który model Autor uważa za lepszy, biorąc pod uwagę analizę potencjału chorobotwórczego rodzaju *Listeria*?

Które czynniki wirulencji analizowanych bakterii, biorąc pod uwagę specyficzność działania przynajmniej części z nich, mogły wpływać na śmiertelność Danio i barciaka?

W badaniach potencjału chorobotwórczego szczepów *L. monocytogenes* z wykorzystaniem Danio oraz barciaka Autor podaje odsetek zainfekowanych larw, które przeżyły. Chciałbym poprosić o wyjaśnienie, czy są jakieś kryteria, które pozwalają sklasyfikować potencjał chorobotwórczy (np. jako wysoki) z użyciem takiego modelu badań oraz czy w przypadku bakterii odznaczających się znacznie mniejszym potencjałem wirulencji niż *L. monocytogenes* (np. ze względu na brak zdolności do wytwarzania toksyn) odsetek przeżywalności wynosić powinien 100%.

Na podstawie wyników analiz z wykorzystaniem barciaka, Autor wnioskuje, że stres termiczny obniża potencjał wirulencji (biorąc pod uwagę wskaźnik przeżycia larw). Czy możliwe, że uzyskane wyniki są determinowane nie tylko zmianami w wirulencji, ale również ogólnej żywotności (w tym np. braku lub zaburzonej zdolności do namnażania) *L. monocytoges*?

W ilu powtórzeniach wykonywano analizy związane ze zmianą antybiotykooporności? Czy obserwowano różnicę w wartościach MIC pomiędzy powtórzeniami biologicznymi?

Wniosek 12 „Za wzrost śmiertelności organizmów modelowych, zainfekowanych pałeczkami *L. monocytogenes* poddanych stresowi termicznemu odpowiadają geny wirulencji inne niż te znajdujące się na LIPI 1", wykracza poza zakres prowadzonych badań. Autor, w żadnej z prac nie przedstawił jednoznacznych wyników świadczących, że za śmiertelność odpowiadały geny wirulencji, lub że były to określone czynniki wirulencji. Co więcej, sam Autor zauważa, że nie stwierdził korelacji między wykrytymi genami kodującymi czynniki wirulencji, a śmiertelnością larw.

Podsumowanie i konkluzja końcowa

Całościowa ocena recenzowanej pracy doktorskiej przygotowanej przez Pana mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego jest w pełni pozytywna. Przedstawione przeze mnie uwagi i pytania nie pomniejszają osiągnięć Doktoranta, co do uzyskanych wartościowych wyników, lecz wynikają z ciekawości naukowej i mają być pomocnymi wskazówkami w realizacji przyszłych przedsięwzięć naukowych. Doktorant udowodnił, że dysponuje dobrym warsztatem badawczym, który umożliwił mu uzyskanie oryginalnych wyników o dużej wartości, zarówno w aspekcie teoretycznym, jak i aplikacyjnym. Do najważniejszych mocnych stron dysertacji należy zaliczyć trafny, ciekawy i aktualny dobór problematyki badawczej, kompleksowy program badań empirycznych, biegłe posługiwanie się literaturą przedmiotu oraz umiejętne prowadzenie analizy uzyskanych wyników. Natomiast prezentacja osiągnięć naukowych, w formie publikacji, w których Doktorant występuje jako pierwszy autor i które opublikowane zostały w wysokiej jakości czasopismach naukowych świadczy o jego dojrzałości i samodzielności oraz podkreśla wartość naukową uzyskanych wyników.

Reasumując, Doktorant udowodnił swoją dojrzałość intelektualną jako młody badacz i naukowiec oraz w mojej opinii jest w stanie podjąć się kolejnych wyzwań naukowych. Rozprawa doktorska pt. „Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów gotowych do spożycia z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii z rodzaju *Listeria* sp." wykonana przez Pana mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego w Katedrze Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa, Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod opieką naukową dr hab. inż. Anny Zadernowskiej, prof. UWM oraz dr inż. Wioletty Chajęckiej-Wierzchowskiej spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023, poz. 742 ze zm.). Biorąc powyższe pod uwagę zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego oraz dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze bardzo wysoką wartość naukową ocenianego cyklu publikacji stanowiącego rozprawę doktorską, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o jej wyróżnienie. Rozprawa doktorska mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego wnosi nie tylko bardzo dużo do naszej wiedzy nad patogennością pałeczek z rodzaju *Listeria*, ale ze względu na możliwość wykorzystania wyników w technologii żywności ma duży potencjał aplikacyjny. Proponowane wyróżnienie jest również wyrazem mojego uznania dla Doktoranta za pracę włożoną w przeprowadzenie badań wyróżniających się oryginalnością zastosowanych metod oraz za umiejętność interpretacji uzyskanych danych, co niewątpliwie świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta i wpływa na wysoki poziom naukowy prac wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską.

Karol Fijałkowski

Prof. dr hab. inż. Karol Fijałkowski