Prof. dr hab. Anna Chmielowiec-Korzeniowska
Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 07.06.2021 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani **mgr inż. Joanny Żebrowskiej** pt. „Opracowanie i ocena skuteczności przeciwdrobnoustrojowej mieszaniny naturalnych olejków eterycznych do profilaktycznego zamgławiania wychowalni indyków*"* wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Doroty Witkowskiej prof. UMW.

Temat pracy jako problem naukowy

Mikroflora powietrza środowiska hodowlanego stała się w ostatnich latach przedmiotem licznych badań naukowych. Prowadzone prace badawcze miały głównie na celu charakterystykę ilościową i jakościową drobnoustrojów występujących w powietrzu budynków inwentarskich, jak również określenie czynników wpływających na jego jakość. W większości publikowanych badań koncentracja ogólnej liczby bakterii przekraczała zalecenia zoohigieniczne ($8{,}0 \times 10^4$ jtk/m^3) [Kołacz i Dobrzański, 2006] oraz higieniczne, ustalone według kryterium zdrowia ludzi, pracujących w tym sektorze ($1{,}0 \times 10^5$ jtk/m^3) [Dz.U.2005.81.716]. Budynki dla drobiu cechują się najwyższym poziomem bioaerozolu bakteryjnego. Istotnym czynnikiem zwiększającym koncentrację mikroorganizmów jest zapylenie, oznaczane tutaj na dużo wyższych poziomach w porównaniu do obór, czy chlewni. Ze względu na możliwość zagrożenia zdrowia ludzi i zwierząt w fermach specjalizujących się hodowlą drobiu, istotne jest nie tylko monitorowanie poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego, ale przede wszystkim podejmowanie odpowiednich działań bioasekuracyjnych. Nieodłącznym elementem higieny i zwalczania czynników chorobotwórczych jest utrzymywanie prawidłowych warunków zoohigienicznych oraz zastosowanie profilaktyki, w tym dezynfekcji środowiska, w którym utrzymywany jest drób.

Na rynku jest obecnie wiele nowych środków dezynfekcyjnych o szerokim zakresie działania i dużej skuteczności ich stosowania. Niestety pojawienie się oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u bakterii komensalnych i patogenów zwierzęcych przyczynia się do wzrostu liczebności genów oporności. Główny problem stanowią szczepy *S. aureus* oporne na metycylinę, tzw. LA MRSA (Livestock Associated Methicillin Resistant *S. aureus*), oraz

szczepy pałeczek Gram-ujemnych, zwłaszcza bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, wytwarzających β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (tzw. ESBL - *extended-spectrum beta-lactamases*), w tym enteropatogennych bakterii z rodzaju *Salmonella, E. coli* i *Campylobacter*. Mimo wprowadzanych zakazów nieterapeutycznego stosowania antybiotyków u zwierząt wciąż zmniejsza się skuteczność profilaktyki i leczenia coraz większej liczby infekcji. Wielkość spożycia środków przeciwdrobnoustrojowych wyraźnie wpływa na poziom izolowanych bakterii lekoopornych, stąd najwyższe rozpowszechnienie oporności odnotowuje się w brojlerniach i indyczarniach, rzadziej w oborach. O skali problemu świadczy raport Światowej Organizacji Zdrowia mówiący o bezwzględnej konieczności zredukowania rozprzestrzeniania się antybiotykoodporności ze źródeł rolniczych [WHO, 2014].

Niepokojąca jest również wysoka częstotliwość pojawiania się szczepów charakteryzujących się wieloopornością. W konsekwencji, niektóre preparaty dezynfekcyjne stają się mniej efektywne, lub w ogóle nieskuteczne w zwalczaniu patogenów, a liczba szczepów opornych wzrasta niewspółmiernie szybko w stosunku do liczby nowo odkrywanych biocydów. Dlatego też, poszukiwanie nowych związków o działaniu bakteriobójczym stało się jednym z priorytetowych kierunków badań w dziedzinie chemii weterynaryjnej. Na szczególną uwagę zasługują badania możliwości wykorzystania produktów roślinnych w roli preparatów działających biostatycznie. Dużo uwagi w literaturze poświęca się badaniom aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej olejków eterycznych przeciwko takim patogenom, jak drożdżaki *Candida albicans*, różne gatunki dermatofitów i grzybów pleśniowych, bakterie *Helicobacter pylori, Neisseria sp., E. coli* oraz oporne na antybiotyki szczepy gronkowców *S. aureus* (MRSA), czy wankomycynooporne *Enterococcus* spp. (vancomycin resistant enterococci–VRE). Wyniki tych badań wskazują na możliwość wykorzystania olejków eterycznych w środowisku hodowlanym. Ich zastosowanie może wpłynąć na obniżenie poziomu mikrobiologicznego zanieczyszczenia budynków inwentarskich, a tym samym na poprawę zdrowia zwierząt i pracowników.

W ten nurt badań włącza się praca doktorska Pani **mgr inż. Joanny Żebrowskiej**. Należy więc podkreślić, że zagadnienia poruszane w pracy są bardzo aktualne i mieszczą się w dyscyplinie Zootechnika i Rybactwo. Uważam, że podjęta tematyka badawcza jest oryginalna i ważna zarówno dla badań podstawowych, jak i aplikacyjnych Przeprowadzone badania mogą przyczynić się do rozwoju nowych metod ograniczających zanieczyszczenia mikrobiologiczne w indyczarniach, a tym samym podnieść bezpieczeństwo epidemiologiczne na fermach.

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani **mgr inż. Joanny Żebrowskiej** obejmuje 157 stron maszynopisu. Na 30. stronach wyodrębniono spis piśmiennictwa obejmujący obszerną bazę publikacji, tj. 301 pozycji, w większości oryginalnych, anglojęzycznych artykułów naukowych, z czego 60% opublikowanych w ostatniej dekadzie. Praca zawiera 35 tabel, 13 wykresów, 2. fotografie oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Na początku rozprawy zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w pracy, co ułatwia dalsze korzystanie z tekstu.

Układ rozprawy jest konwencjonalny i nie budzi zastrzeżeń, jedyne uwagi w tym zakresie dotyczą podrozdziałów, które moim zdaniem należałoby połączyć (szczegóły poniżej). Pracę rozpoczyna rozdział „Wstęp i przegląd piśmiennictwa", który stanowi interesującą syntezę ważnych problemów związanych ze specyfiką zanieczyszczeń mikrobiologicznych występujących w fermach drobiu, zagrożeń przez nich powodowanych, w tym coraz częściej pojawiającym się zjawisku lekooporności. Ważnym elementem przeglądu piśmiennictwa jest omówienie charakterystyki wybranych olejków eterycznych, ich składu, mechanizmów bójczego działania oraz zastosowanie.

Podjęte na tym tle badania, których głównym celem było opracowanie naturalnego preparatu na bazie wybranych olejków eterycznych do profilaktycznego zamgławiania budynków fermowych przeznaczonych do wychowu indyków uważam za celowe i aktualne, legitymujące się ponadto praktycznym aspektem zastosowania w praktyce zootechnicznej.

Autorka dokonując uzasadnienia wyboru problemu badawczego, a następnie przygotowując się do przeprowadzenia badań przyjęła następujące hipotezy badawcze:

- Aplikacja preparatu na bazie olejków eterycznych w formie zamgławiania ograniczy występowanie mikroorganizmów w środowisku bytowania indyków rzeźnych.
- Zastosowanie wieloskładnikowego komponentu wybranych olejków eterycznych poszerzy spektrum działania i zwiększy aktywność przeciwdrobnoustrojową preparatu.
- Zamgławianie powietrza wieloskładnikowym preparatem na bazie olejków eterycznych może okazać się skuteczne w profilaktyce wobec patogennych, w tym wieloopornych izolatów bakterii pochodzących z ferm indyczych.

Podejmowany w projekcie problem, przyjęte cele, jak również sam charakter aplikacyjny badań zadecydowały o wyborze metodyki badań. Autorka w rozdziale „Materiał i metody badań" przedstawiła ogólne założenia metodyczne realizowanych zadań.

Badania przeprowadzono w trzech etapach. Materiał do I etapu badań stanowiły wycinki narządów wewnętrznych indyków utrzymywanych na fermach zlokalizowanych w północno-wschodniej Polsce, zgromadzone w archiwum Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Olsztynie. W etapie tym, dla szczepów najczęściej izolowanych z tkanek. tj. *Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus* oraz *Ornithobacterium rhinotracheale* wykonano ocenę wrażliwości na antybiotyki. W II etapie badań materiałem badanym było 12 olejków eterycznych, w tym tymiankowy, z mięty pieprzowej, eukaliptusowy, z drzewa herbacianego, cytrynowy, cynamonowy, goździkowy, melisowy, bazyliowy, anyżowy, lawendowy oraz rozmarynowy, dla których przeprowadzono ocenę aktywności bakteriobójczej. Ocenę przeprowadzono metodą dyfuzyjno-krążkową, studzienkową oraz oznaczając minimalne stężenie hamujące (MIC) wobec bakterii izolowanych z narządów oraz szczepów testowych / referencyjnych. Na podstawie uzyskanych wyników opracowano skład preparatu olejkowego o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych zastosowanego w III etapie badań do profilaktycznego zamgławiania powietrza budynków dla indyków rzeźnych. W badaniach aplikacyjnych na podstawie oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza oraz powierzchni wychowalni oceniono skuteczność dekontaminacji.

W tym miejscu należy podkreślić kompleksowość wykonanych badań (badania laboratoryjne poparte badaniami aplikacyjnymi). Zastosowane metody pomiarowe i analizy należą do ogólnie przyjętych metod i są zgodnie z wytycznymi Europejskiego Komitetu ds. Badania Wrażliwości Drobnoustrojów (EUCAST).

Podrozdział „Wyniki badań i dyskusja" stanowi zasadniczą część dysertacji. W rozdziale tym Doktorantka wykazała się znaczną wiedzą oraz umiejętnością interpretacji i konfrontowania uzyskanych wyników z rezultatami innych autorów.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała 8 wniosków, ż czego kluczowe, w moim odczuciu są:

- Zmienność aktywności przeciwbakteryjnej poszczególnych olejków eterycznych jest determinowana przez rodzaj badanego szczepu bakterii, stężenie olejku oraz zastosowaną metodę badawczą.
- Najwyższą aktywnością przeciwbakteryjną zarówno drobnoustrojów G+ i G- charakteryzuje się olejek cynamonowy, goździkowy i tymiankowy. Olejek cytrynowy wykazuje znikome działanie przeciw bakteriom *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Ornithobacterium rhinotracheale, Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* pochodzącym od indyków rzeźnych.

– Aplikacja preparatu na bazie olejków eterycznych w formie zamgławiania ogranicza występowanie mikroorganizmów w środowisku bytowania indyków rzeźnych.

Jednocześnie Doktorantka podkreśliła, że zamgławianie powietrza wieloskładnikowym preparatem na bazie olejków eterycznych wykazuje wysoki potencjał utrzymania standardów higienicznych na fermach i może okazać się skutecznym sposobem profilaktyki stosowanej wobec patogennych (w tym wieloopornych) izolatów bakterii pochodzących z ferm indyczych.

W tym miejscu zwracam uwagę, że wniosek nr 1 tj. „Nie stwierdza się sezonowości w występowaniu bakterii *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Ornithobacterium rhinotracheale, Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* na fermach indyków rzeźnych." nie potwierdza, żadnej ze stawianych hipotez, ani też nie odpowiada na postawione cele, stąd w moim odczuciu powinien być usunięty. Również wniosek nr 6 brzmiący „Zastosowanie wieloskładnikowego komponentu wybranych olejków eterycznych poszerza spektrum działania i zwiększy aktywność przeciwdrobnoustrojową mieszaniny" nie ma podstaw, gdyż w pracy nie porównywano efektywności działania pojedynczych olejków z wieloskładnikowym preparatem.

Uwagi o charakterze ogólnym i korektorskim

Moja ocena strony redakcyjnej rozprawy Pani **mgr inż. Joanny Żebrowskiej** jest wysoka. Praca została napisana poprawnym językiem, jest czytelna, a zawarta w niej ilość błędów stylistycznych i interpunkcyjnych marginalna.

Podczas czytania pracy nasuwa się jednak kilka uwag, które Doktorantka może wykorzystać podczas przygotowywania pracy do druku. Moje sugestie i zastrzeżenia pogrupowałam chronologiczne według rozdziałów pracy, których dotyczą.

Spis treści

Sugeruję ograniczenie liczby tworzonych podrozdziałów i nieznaczne ich przeredagowanie. W rozdziale I, podrozdział 3 „Charakterystyka wybranych bakterii występujących u indyków fermowych" oraz podrozdział 4 „Ptaki fermowe jako potencjalne źródło bakterii zoonotycznych" powinien być połączony w jeden podrozdział. Podobna uwaga dotyczy kolejnych podrozdziałów. Sugeruję utworzenie połączonego (6, 7, 8) podrozdziału dotyczącego antybiotyków i lekooporności bakterii oraz podrozdziału (10 z 11) omawiającego charakterystykę wybranych olejków eterycznych. Tytułu dalszych podrozdziałów sugerowałabym rozbudować. „Hipoteza", czy „Cel" brzmi zbyt lakonicznie.

Skróty stosowane w pracy

Nazwy polskie powinny być poprzedzone nazwami w języku angielskim, z którego większość skrótów się wywodzi.

Przegląd piśmiennictwa

W pracy Autorka odwołuje się do progowych wartości ustalonych dla pracowników a nie wskazuje żadnych zaleceń zoohigienicznych, w tym zestawionych w publikacji: Kołacz R., Dobrzański Z., 2006. Higiena i dobrostan zwierząt gospodarskich. Wrocław: Wydaw. AR.

Materiał i metody badań

Brakuje w pracy wskazania, co było materiałem badań. Z założeń pracy wynika, że w pierwszym etapie były to wycinki narządów pobranych od indyków, w II testowane olejki, zaś w III próby powietrza i wymazów z wychowalni indyków pobranych w 3 kolejnych seriach (po odkażaniu, przed i po zamgławianiu).

Prowadząc ocenę bakteriobójczą Autorka wykorzystała izolaty pozyskane z wycinków serca, płuc, wątroby, woreczka żółciowego oraz śledziony, a także szczepy referencyjne. Proszę podać, jakie i z jakich kolekcji użyto bakterie wzorcowe. Podczas przygotowywania pracy do druku konieczne jest uzupełnienie danych firmy skąd pozyskano kolekcję szczepów. Zapis ten dotyczy również podłoży i sprzętu wykorzystanego w badaniach.

Brakuje omówienia metodyki oznaczania minimalnego stężenia hamującego dla testowanych olejków. Proszę zdefiniować MIC i podać pełną metodykę.

W żadnej z metod nie podano gęstości inokulum wysiewanego na podłoża.

Proszę wskazać, które analizy powietrza zostały przeprowadzone metodą sedymentacyjną, a które aspiracyjną. Czy wyniki uzyskane przy różnych metodach poboru można porównywać?

Błędem jest wskazanie składu wytypowanej mieszaniny olejków eterycznych już w metodyce badań. W założeniach badawczych typowanie olejków miało być prowadzone w oparciu o wyniki badań z etapu II. Tę część należy przenieść do rozdziału „Wyniki i dyskusja".

Jak wybrano udział procentowy poszczególnych olejków w mieszaninie i dlaczego w składzie mieszaniny znalazł się olejek cytrynowy, który jak wynika z oceny aktywności bójczej wyciągów charakteryzował się niewielkim działaniem?

Omawiając część aplikacyjną niedosyt budzi opis miejsca doświadczenia, tj. charakterystyka wychowalni indyków, w tym obsada, system wentylacji, pojenia i karmienia, a przede wszystkich system utrzymania ptaków. Te parametry stanowią istotne czynniki decydujące o poziomie zanieczyszczenia mikrobiologicznego oznaczanego w budynku.

Niepełne jest omówienie zastosowanych analiz statystycznych. W metodyce nie uwzględniono oceny hierarchicznej analizy skupień.

Wyniki badań i dyskusja

Wyniki badań powinny być omawiane według schematu ujętego w rozdziale „Materiał i metody badań".

Omawiając mikroorganizmy izolowane z narządów wewnętrznych jednodniowych indyków niewłaściwe jest porównywanie z wynikami autorów badających bioaerozol kurników. Warto byłoby odnieść się do publikacji oceniających szczepy izolowane przy zakażeniach wewnętrznych ptaków. Poniżej przytaczam kilka tytułów publikacji.

1. Kallapura G., Botero A., Layton S., Bielke L.R., Latorre J.D., Menconi A., Hernández-Velasco X., Bueno D.J., Hargis B.M., Téllez G. 2014. Evaluation of recovery of *Salmonella* from trachea and ceca in commercial poultry. J Appl. Poult. Res. 23(1), 132-136.
2. Abbasi A.G., Abro S.H., Kamboh A.A., Kalhoro D.H., Mazari M.Q., Arain M.B., Vistro W.A., Memon M.A., Memon M.A., Depar S.H. 2020. Epidemiological studies on bacterial respiratory infections in commercial poultry of district Hyderabad, Sindh, Pakistan. Pure Appl. Biol. 9(2), 1253-1265.
3. Patel J.G., Patel B.J., Joshi D.V., Patel S.S., Raval S.H., Parmar R.S., Chauhan H.C., Chandel B.S. 2017. Culture based isolation of pathogenic bacteria associated with respiratory disease complex in broiler with special reference to *Ornithobacterium rhinotracheale* from India. Pure Appl. Microbio. 2017., 11(4), 1919-1924.
4. Rocha e Silva R.C., Cardoso W.M., Teixeira R.S.C., Horn R.V., Cavalcanti C.M., Almeida C.P., Sampaio F.P., Albuquerque A.H., Lopes E.S., Gomes Filho V.J.R., Bezerra W.G.A., Vasconcelos Filho F.S.L., Freitas M.L. 2015. Recovery of *Salmonella* Gallinarum in the organs of experimentally-inoculated Japanese quails (*Coturnix coturnix*). Braz. J. Poult. Sci. 17(3), 281-286.

Ryciny 3 – 7 nie są czytelne oraz nie wnoszą nic co nie można byłoby wnioskować z tabel. Ciekawsze byłoby wskazanie, z jakich tkanek pochodziły wyizolowane szczepy.

Na stronie 52. Doktorantka użyła błędnego sformułowania pisząc „…stwierdzono stosunkowo dużą liczbę antybiotyków cechujących się wysoką opornością w stosunku do pałeczek *E.coli*…". To bakterie wykazują leko- lub antybiotykooporność.

W podrozdziale 2.1. dwa razy pojawia się podpunkt a i podpunkt b. Mogę się tylko domyślać, że w pierwszej części omówienie dotyczy analiz przeprowadzonych dla szczepów referencyjnych, zaś w drugiej części szczepów wyizolowanych od indyków. Proszę to wyraźnie zaznaczyć.

Ciekawe zestawienie wyników zamieszczono w tabelach 17 – 21. Wyniki te potwierdzają, że szczepy środowiskowe są mniej wrażliwe na biocydy, niż szczepy wzorcowe – referencyjne. Czy wykresy 6 -9 nie są powieleniem tych tabel?

W tabelach 22 – 26 Autorka podaje liczbę szczepów wrażliwych, zaś jak wynika z tytułu tych tabel powinny zawierać wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) rozwój testowanych olejków, które zgodnie z definicją podaje się w mg/l.

W części aplikacyjnej niewłaściwie zastosowano nazewnictwo materiału ściołowego – grupa doświadczalna i kontrolna. Materiał ściołowy jest to ta sama grupa tylko oceniana na różnych etapach postępowania – w różnych seriach.

Godna uwagi jest tak niewielka liczba błędów interpunkcyjnych. Poniżej zamieściłam uwagi natury edytorskiej:

- w przeglądzie piśmiennictwa nie zgadza się numeracja podrozdziału nr 3 (w spisie piśmiennictwa oznaczony jako nr 4);
- str. 17 „gatunki grzybów" należy zmienić na „rodzaje grzybów";
- przy każdym rodzaju bakterii i grzyba, gdy nie używamy określenia „rodzaj" należy uzupełnić o zapis „sp.";
- porównując wzrost odsetka szczepów wykazujących oporność należy dodać „punkty procentowe" np. „…był o 37% p.p. niższy w porównaniu…";
- tabele 8 – 11 - niepoprawna legenda – wartości porównywano w kolumnach a nie w wierszach - porównanie wielkości stref zahamowania testowanych olejków;
- str. 102 i 112 - dwie tabele o tym samym numerze;
- tabela 32 – 34 – należy uzupełnić opis wierszy tytułowych (co oznaczają numery 1 2, 3 4?).

Podsumowując ocenę pracy Pani **mgr inż. Joanny Żebrowskiej** stwierdzam, że Autorka przedstawiła ważny z punktu widzenia nauki oraz praktyki problem. Oceniana praca mimo kilku krytycznych, ale i dyskusyjnych uwag wnosi wiele ciekawych elementów zarówno poznawczych, jak i praktycznych w chowie indyków. Doktorantka w pełni zrealizowała postawione cele badawcze. Zebrane piśmiennictwo związane z tematyką pracy zostało poprawnie dobrane i wykorzystane zarówno we wstępie, jak i przy interpretacji uzyskanych wyników badań własnych. Na podkreślenie zasługują staranne i wykonane z dużym nakładem pracy i osobistego zaangażowania badania, zwłaszcza w zakresie oceny skuteczności bakteriobójczej testowanych olejków.

Stwierdzam, że oceniana praca wnosi nowe elementy poznawcze oraz spełnia warunki stawiane pracom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14. marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.), dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w

Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Żebrowskiej do publicznej obrony.