UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE
Wydział Biologii i Biotechnologii
Zakład Genetyki i Mikrobiologii

Lublin, 30.08.2018

dr hab. Sylwia Wdowiak-Wróbel
Zakład Mikrobiologii i Genetyki UMCS
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
tel. 81 537 59 70
e-mail: s.wdowiak@poczta.umcs.lublin.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt.: Oporność na tetracykliny u bakterii izolowanych od chorych ryb akwariowych, wykonanej przez Panią mgr Natalię Walczak w Zakładzie Chorób Ryb i Biologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem promotora Pana dr. hab. Leszka Guza i promotora pomocniczego dr. Sebastiana Gnata.

Stres, zanieczyszczenie środowiska, czy też nieprawidłowe żywienie może doprowadzić do osłabienia odporności i rozwoju chorób u ryb akwariowych. Do najczęściej występujących chorób ryb zaliczymy: mykobakteriozę, martwicę płetw, zapalenie jamy gębowej, wibriozę, chorobę wrzodową, ichtiofonozę, czy też pleśniawkę. Bakteryjne zakażenia ryb wywoływane są zarówno przez bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Wśród bakterii odpowiedzialnych za infekcje ryb wyróżnić możemy przedstawicieli rodzaju: *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Shewanella* sp., *Citrobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Plesiomonas* sp., czy też *Mycobacterium* sp. Choroby ryb akwariowych powodują zwiększenie śmiertelności osobników, prowadząc do dużych strat finansowych. Przyczyniają się także do zwyrodnienia kolejnych pokoleń. W celu zwalczania infekcji bakteryjnych w warunkach akwakultury wykorzystuje się antybiotyki, chemioterapeutyki oraz różnego rodzaju związki dezynfekcyjne. Należy jednak podkreślić, że stosowanie antybiotyków może przyczyniać się do selekcji antybiotykoopornych szczepów bakteryjnych, a wykształcona oporność może być przekazana szczepom patogennym również dla człowieka. W związku z powyższym podjęcie przez mgr Natalię Walczak problematyki związanej z pracą doktorską, wydaje się ważne i w pełni uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa naukowa liczy 116 stron. Składa się z zasadniczych rozdziałów typowych dla prac eksperymentalnych, takich jak wstęp, cel pracy, materiały i metody, części przedstawiającej wyniki oraz ważnej pod względem naukowym dyskusji. Główne rozdziały poprzedza wykaz stosowanych skrótów, natomiast końcową część pracy stanowią wnioski, streszczenie w wersji anglojęzycznej, bogaty spis literatury liczący 228 pozycji oraz spis stron internetowych. Rozprawa doktorska zawiera 37 tabel oraz 12 rycin.

Część teoretyczna pracy obejmuje 18 stron i jest podzielona na 6 rozdziałów. Została ona poświęcona zagadnieniom dotyczącym chorób wywoływanych przez różne rodzaje bakterie u ryb akwariowych, metod stosowanych w leczeniu zakażeń bakteryjnych, charakterystyki antybiotyków tetracyklinowych, mechanizmów oporności na tę grupę antybiotyków oraz charakterystyki związków dezynfekcyjnych wykorzystywanych w akwarystyce. Zagadnienia przedstawione przez Doktorantkę świadczą o dobrej znajomości danych literaturowych i odpowiednim przygotowaniu do przeprowadzonych badań.

Uważam, że we Wstępie powinny zostać przedstawione informacje dotyczące metod molekularnych wykorzystywanych w taksonomii bakterii. Szczególnie brakuje informacji na temat wykorzystania metody MALDI-TOF w identyfikacji szczepów bakteryjnych. W związku z tym proszę Doktorantkę o wyjaśnienie na czym polega identyfikacja bakterii w oparciu o metodę MALDI-TOF. Dodatkowo proszę o informacje, czy zastosowanie tej metody pozwala na określenie pozycji taksonomicznej analizowanych szczepów bakterii na poziomie rodzaju, czy także gatunku?

Dodatkowo na stronie 6 dobrze by było podać polskie nazwy wymienionych gatunków ryb. W zdaniu na stronie 16 „ …nowo powstałe wiriony z częściowo wbudowanym DNA bakteryjnym opuszczają komórkę żywiciela….” Słowo żywiciel powinno być zastąpione sformułowaniem „ opuszczają komórkę gospodarza …”. Na stronie 16 zamiast „ …w stężeniu od 40 do 80 ml L^{-1} wody.” powinno być „…w ilości od 40 do 80 ml na litr wody.”

W rozdziale Cel pracy Doktorantka wyjaśniła przyczyny podjęcia badań oraz w jasny i logiczny sposób sformułowała pięć podstawowych celów badawczych.

W następnym rozdziale pracy opisane zostały wykorzystane materiały i zastosowane metody badań. Na podkreślenie zasługuje fakt przebadania przez Doktorantkę dużej liczby izolatów (240 szczepów bakterii), uzyskanych od 123 ryb akwariowych.

Pragnę jednak zwrócić uwagę na drobne błędy w tej części pracy. Na stronie 29 w zdaniu „Elektroforezę przeprowadzano w 1% żelu agarozowym zawierającym barwnik SYBR Green oraz 10x stężonym roztworze buforu TBE", powinno być raczej „ ...oraz 1x stężonym buforze TBE". Na stronie 30 można było pominąć informację o niedodawaniu buforu obciążającego lub wyjaśnić, że był on składnikiem mieszaniny do reakcji PCR. W rozdziale 3.8 podane są numery szczepów referencyjnych, ale brakuje informacji, jakie gatunki one reprezentują. Natomiast w rozdziale 3.9 oprócz badanych stężeń związków dezynfekcyjnych dobrze by było podać stężenia tych związków zaakceptowane do stosowania w akwakulturach. Natomiast Tabela ze strony 116 powinna znajdować się w rozdziale Materiały i metody.

W rozdziale Wyniki Doktorantka przedstawiła uzyskane dane eksperymentalne w postaci 27 tabel i 10 rycin. Ten rozdział został podzielony na 6 podrozdziałów, obejmujących: (i) identyfikację bakterii; (ii) wykrywanie genów oporności na tetracykliny; (iii) sekwencjonowanie produktów PCR; (iv) wartości MIC tetracyklin; (v) wartości MIC środków dezynfekcyjnych stosowanych w akwarystyce oraz (vi) badanie oporności metodą dyfuzyjno-krążkową. W oparciu o metodę MALDI-TOF zidentyfikowane zostały bakterie chorobotwórcze wyizolowane z lokalnych hodowli akwarystycznych. Izolaty reprezentowały rodzaje *Aeromonas*, *Acinetobacter, Citrobacter, Pseudomonas, Plesiomonas, Vibrio* i *Shewanella*, wśród nich dominował rodzaj *Aeromonas*. Badania wykazały, że geny *tetA* i *tetE* były najczęściej występującymi genami oporności na tetracykliny u analizowanych szczepów. Większość analizowanych szczepów wykazywała oporność na antybiotyki tetracyklinowe. Jedynie w przypadku tygecykliny nie stwierdzono szczepów opornych na ten antybiotyk. Ważną obserwacją było wykazanie, że przebadane izolaty charakteryzowały się wrażliwością na wszystkie przebadane środki dezynfekcyjne.

Oceniając cześć eksperymentalną rozprawy doktorskiej, należy podkreślić, że badania zostały poprawnie zaplanowane i przygotowane. Chciałam jednak zauważyć, że w objaśnieniach pod ryc. 5 brakuje informacji o szczepach, dla których zostały zamplifikowane fragmenty genów oporności na tetracykliny. Takiej informacji nie ma również w przypadku sekwencjonowania produktów PCR. W związku z tym mam pytanie, dla jakiego szczepu/szczepów, zostały zsekwencjonowane geny *tet*? Myślę, że w przypadku antybiotyków innych niż tetracykliny dobrze by było ustalić wartości MIC. W przypadku sekwencji nukleotydowych genów *tet* powinny one zostać zgłoszone do bazy danych i posiadać numery dostępu. Ponadto, mam pytanie, czy te

fragmenty genów były amplifikowane z dwóch nici? Jeżeli tak, to dlaczego została podana sekwencje tylko jednej, zamiast całej złożonej z obydwu nici?

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały rzeczowo omówione w rozdziale Dyskusja, w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych. Autorka zwróciła uwagę na problem lekooporności u bakterii chorobotwórczych ryb akwariowych, a także pokreśliła, że szczepy patogenne stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia osób zajmujących się hodowlą ryb. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała logiczne wnioski, które stanowią syntetyczne podsumowanie wykonanej pracy badawczej. Całość pracy zamyka obszerna część literaturowa, licząca 228 pozycji.

Rozprawa została napisana zrozumiałym, poprawnym językiem. Nieliczne błędy edytorskie nie mają wpływu na jakość pracy.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska pt. „Oporność na tetracykliny u bakterii izolowanych od chorych ryb akwariowych" wykonana przez Panią mgr Natalię Walczak stanowi oryginalne opracowanie, posiadające ważny aspekt teoretyczny i praktyczny, szczególnie w kontekście wzrastającej oporności bakterii na antybiotyki. Recenzowana praca spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim, zawarte w Ustawie z dnia 18.03.2011 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Natalii Walczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

000001353
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19