UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII LEKARSKIEJ
KIEROWNIK: DR HAB. N. MED. TOMASZ M. KARPIŃSKI, PROF. UM

ul. Rokietnicka 10
60-806 Poznań

tel.: 61 641-85-62
e-mail: tkarpin@ump.edu.pl

Poznań, 03.11.2023.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Aliny Kiełpińskiej

pt. „Ocena aktywności przeciw-*Clostridium perfringens* wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej oraz możliwości ich wykorzystania do produkcji probiotycznych dodatków paszowych"

przygotowanej pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Anny Sip

w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi monografię naukową. Temat pracy jest niezwykle ważny, ponieważ bakterie *Clostridium perfringens* są istotnym patogenem zwierząt hodowlanych. Narastająca oporność bakterii na antybiotyki oraz zatwierdzenie przez Parlament Europejski zakazu prewencyjnego stosowania antybiotyków w rolnictwie, wpłynęło na potrzebę szukania nowych metod ograniczania zakażeń. W rozprawie doktorskiej wykazano antagonistyczne działanie probiotyków względem *C. perfringens*.

Rozprawa obejmuje przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, stwierdzenia końcowe i wnioski. W skład rozprawy wchodzą również spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis literatury i załącznik. Praca jest obszerna, zawiera 188 stron plus 13 stron załącznika, 46 wykresów, 62 tabele, 12 fotografii i 4 ryciny. W pracy zacytowano 313 artykułów, 6 raportów i 8 norm.

We wstępie Doktorantka przedstawiła charakterystykę, chorobotwórczość i diagnostykę bakterii *C. perfringens.* Dalej opisała metody ograniczania zakażeń *C. perfringens* u zwierząt, w tym antybiotykoterapię, zmiany sposobu żywienia, szczepienia ochronne i terapie probiotyczne. Działanie probiotyków oparte jest na kilku mechanizmach:

kolonizacji i antagonizmie wobec innych mikroorganizmów, syntezie różnych substancji przeciwdrobnoustrojowych, modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz zwiększeniu strawności paszy i przyswajalności składników odżywczych.

Celem rozprawy było opracowanie probiotyku, jako dodatku paszowego, mającego zdolność do hamowania rozwoju *C. perfringens*.

Doktorantka wykorzystała w pracy liczne metody badawcze. Zaczęła od izolacji i hodowli bakterii, w tym *C. perfringens* oraz 23 innych gatunków, zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Następnie zbadała aktywność izolatów przeciw *C. perfringens* metodą punktową i metodą krytycznych rozcieńczeń. Z wybranych szczepów izolowano genomowe DNA w celu wykrycia genów kodujących toksyny *C. perfringens,* a także amplifikowano sekwencje 16S rDNA, aby zidentyfikować wybrane bakterie. Kolejne badania dotyczyły oznaczenia hydrofobowości komórek bakterii, liczby żywych komórek, adhezji bakterii do mucyn, tolerancji na niskie pH i żółć, przeżywalności w warunkach symulujących stres żołądkowo-jelitowy, wrażliwości na antybiotyki, aktywności hemolitycznej i zdolności hydrolizy soli żółciowych, Następnie, Doktorantka zbadała aktywność wybranych bakterii oraz ich metabolitów wobec *C. perfringens.* Identyfikowano także związki białkowe o aktywności przeciw *C. perfringens.* Ostatnią częścią badań była optymalizacja parametrów hodowli i składu pożywki w celu otrzymania preparatów probiotycznych, hodowle bioreaktorowe, suszenie i liofilizacja otrzymanych preparatów oraz testy przechowalnicze.

Uzyskane wyniki przedstawiono na 88 stronach. W skrócie, Doktorantka otrzymała 41 szczepów aktywnych wobec *C. perfringens*. Jednak po wykonaniu badań właściwości bakterii, ostatecznie do preparatów probiotycznych włączono tylko trzy szczepy: *Enterococcus faecium* 10t, *Lactobacillus paracasei* 11c i *L. plantarum* 12k. Wybrane szczepy posiadały silne właściwości adhezyjne i wysoką przeżywalność w badaniach symulacji żołądkowo-jelitowej. Wykazano też, że *L. paracasei* 11c wytwarza bakteriocynę klasy IIa, zaś *L. plantarum* 12k dwa peptydy o aktywności przeciw *C. perfringens*. Aktywność *E. faecium* 10t związana była natomiast z działaniem konkurencyjnym. W ramach oceny warunków produkcji preparatów probiotycznych, stwierdzono, że do produkcji przemysłowej najbardziej nadaje się pożywka z mąki kukurydzianej z glukozą, inuliną, ekstraktem drożdżowym i

ekstraktem sojowym. Plon biomasy zwiększono poprzez dodatek białek owadzich. Wykazano także, że preparaty otrzymane z hodowli półstałych mają wyższą aktywność niż preparaty produkowane w sposób konwencjonalny. Związane jest to z dużą stabilnością metabolitów szczepów probiotycznych podczas przechowywania, w odróżnieniu od samych bakterii je produkujących.

Wśród walorów ocenianej rozprawy doktorskiej należy wymienić unikalną kolekcję szczepów *C. perfringens*, która powinna zostać zabezpieczona do innych badań. Istotne są także aspekty technologiczne, w tym wykazanie, że otrzymane produkty probiotyczne mogą być zmieszane z paszą i zastosowane w celowanym działaniu przeciw *C. perfringens.* Co ważne, preparaty probiotyczne to nie tylko komórki bakteryjne, ale także metabolity, które mogą wykazywać większą aktywność w mniejszej objętości ostatecznego produktu.

W rozprawie pojawiły się jednak aspekty wymagające korekty lub wyjaśnienia:

1. Doktorantka nie przedstawiła, w jakich jednostkach (katedrach, zakładach, pracowniach) zostały wykonane poszczególne badania oraz z jakimi osobami współpracowała. Obszerna metodyka badawcza sugeruje, że badania były wykonywane w różnych podjednostkach Uniwersytetu Przyrodniczego.
2. W wielu miejscach nie podano nazwy i kraju producenta np. podłoży mikrobiologicznych, czy też nazwy i producenta zastosowanej aparatury np. termocyklera PCR.
3. Otrzymane metabolity wykazują działanie przeciw *C. perfringens*. Czy sprawdzono też możliwość toksycznego działania metabolitów zawartych w preparatach suszonych z całym złożem na bakterie probiotyczne blisko spokrewnione?
4. Doktorantka stwierdziła, że szczep *Enterococcus faecium* może być probiotykiem. Jednak, wiadomo, że bakterie *E. faecium* są patogenami człowieka i zwierząt, często wieloopornymi. Dane wskazują, że przy posocznicy enterokokowej śmiertelność może sięgać do 50% a w przypadkach zakażeń enterokokami wankomycynoopornymi (VRE) nawet 75% [Życie Wet. 2013; 88(7): 562-564]. Enterokoki mogą być też przyczyną zakażeń odzwierzęcych. Czy wykazała Pani rzeczywiste bezpieczeństwo szczepu dla zwierząt i ludzi?

5. W tabelach 34, 37 i 40 brakuje interpretacji, czy szczepy są wrażliwe czy oporne na dane antybiotyki. Doktorantka wykazała, że tylko brak strefy (0 mm) oznacza oporność. A jak należy zinterpretować strefy np. 10 mm czy 12 mm, jako wrażliwe czy oporne? Ponadto, jeżeli krążek ma 6 mm średnicy, to brak strefy oznaczamy jako „6 mm", a nie 0 mm. Wyniki powinny zostać zinterpretowane zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) lub European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).
6. Problem opisany w punkcie 5. jest szczególnie istotny w Tabeli 34, w której Doktorantka przedstawiła lekowrażliwość szczepu *E. faecium* 10t. Jednak, brakuje interpretacji wyników zgodnej z wytycznymi. Enterokoki posiadają naturalną oporność na cefalosporyny, niskie stężenia aminoglikozydów, trimetoprim/sulfametoksazol, linkosamidy a *E. faecium* ma dodatkowo obniżoną wrażliwość na penicyliny. Jak wobec tego należy zinterpretować uzyskane strefy dla cefoksytyny i cefpodoksymu?

Podsumowując, rozprawa doktorska stanowi wartościowy dorobek naukowy. Ma ona wymiar praktyczny i może przyczynić się do powstania nowego produktu probiotycznego dla zwierząt. Doktorantka zrealizowała zaplanowany cel, wykazała przygotowanie merytoryczne i opanowała metodologię badawczą. Jednak, jak przedstawiłem wyżej, praca wymaga niewielkich poprawek, w szczególności związanych z potwierdzeniem bezpieczeństwa produktu oraz interpretacją lekowrażliwości.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668, z późn. zm.). Wobec tego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Aliny Kiełpińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Kierownik
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej

Dr hab. n. med. Tomasz M. Karpiński, Prof. UM