

Warszawa, 03.12.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr inż. Iwony Marii Kawackiej

Pt.: Analiza bioróżnorodności izolatów bakterii *Listeria monocytogenes* pochodzących z przemysłu mięsnego w kontekście ich wrażliwości na chlorek benzalkoniowy

Wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Pod opieką promotora: dr hab. Agnieszki Olejnik-Schmidt

Niniejsza recenzja została przygotowana zgodnie z Uchwałą 4/III/2024 Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 24 października 2024 r., w sprawie powołania recenzentów rozprawy doktorskiej mgr inż. Iwony Marii Kawackiej.

Mgr inż. Iwona Maria Kawacka ukończyła w 2019 roku studia magisterskie na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Pracę dyplomową zrealizowała w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności.

Z przedstawionej dokumentacji nie wynika czy Doktorantka ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

W czasie studiów i po ich ukończeniu pracowała kolejno jako stażysta w laboratorium analiz fizykochemicznych Unilever w Poznaniu, stażysta w laboratorium zapewnienia jakości LISNER w Poznaniu oraz młodszy specjalista ds. zapewnienia jakości w zakładzie LISNER w Poznaniu.

Mgr inż. Iwona Maria Kawacka rozpoczęła kształcenie w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w październiku 2020. A od maja 2023 jest zatrudniona na stanowisku starszego referenta technicznego na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu.

Ponadto w lipcu i sierpniu 2022 odbyła staż naukowy w instytucie Roberta Kocha w Niemczech. Doktorantka jest współautorem 9 publikacji naukowych w czasopismach z listy JCR.

Rozprawa doktorska mgr inż. Iwony Marii Kawackiej, która stanowi podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie technologii żywności i żywienia, ma charakter zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie pięciu artykułów naukowych, co jest zgodne z Art. 187. 1. ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami). W przedstawionej do recenzji pracy pisemnej zbiór publikacji został opatrzone komentarzem w języku polskim. Posiada on układ tradycyjny dla rozpraw doktorskich: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp wraz z uzasadnieniem i charakterystyką problemu badawczego, cel i zakres badań, hipotezy badawcze, omówienie wyników, podsumowanie wraz z wnioskami i ustaleniami, spis literatury. Ponadto zawiera kopie publikacji stanowiących zbiór oraz oświadczenia o wkładzie poszczególnych autorów w ich powstanie.

Prace zawarte w ocenianym zbiorze zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR w latach 2022-2024. Cztery z publikacji to prace oryginalne opublikowane w: Żywność. Nauka. Technologia. Jakość., (IF=0,000; 20 pkt MNiSW), Life (IF=3,200; 70 pkt MNiSW), Pathogens (IF=3,300; 100 pkt. MNiSW), Antibiotics (IF=4,300; 70 pkt. MNiSW) oraz jedna praca przeglądowa opublikowana w Microorganisms (IF=4,926; 40 pkt MNiSW). Sumaryczny IF zbioru publikacji wynosi 15,726, 300 pkt. MNiSW; Indeks Hirsha 4 (Scopus 29.11.2024).

We wszystkich publikacjach stanowiących zbiór Doktorantka jest pierwszym autorem, a w większości także korespondencyjnym. Udział Doktorantki w powstaniu publikacji wynosi średnio 77% i zgodnie z załączonymi oświadczeniami nie budzi wątpliwości co do jej kluczowej roli w ich powstaniu.

Listeria monocytogenes, patogen przenoszony przez żywność, jest czynnikiem wywołującym listeriozę, ciężką chorobę, szczególnie niebezpieczną dla osób starszych, kobiet w ciąży i noworodków. Chociaż zakażenie to jest stosunkowo rzadkie, to obserwowana jest jednak wysoka śmiertelność, wynosząca 20-30% przypadków. Niepokojący jest również odnotowany wzrost zachorowań w Unii Europejskiej o 15,9% (rok 2022 w stosunku do 2021). *L. monocytogenes* może adaptować się, przetrwać, a nawet rozwijać się w szerokim zakresie warunków stresowych środowiska produkcji żywności. Ponadto bakteria ta jest również w stanie tworzyć struktury biofilmu na różnych powierzchniach w środowiskach produkcji żywności, co utrudnia jej usunięcie i pozwala jej przetrwać prowadząc do wtórnych zanieczyszczeń żywności. W celu eliminacji drobnoustrojów, w tym także bakterii *L. monocytogenes*, ze środowiska produkcyjnego, wykonywane są procedury dezynfekcji. Środkami wykorzystywanymi do tego celu są między innymi związki z grupy IV-rzędowych soli amoniowych, do których należy chlorek benzalkoniowy. Problem wielolekooporności bakteryjnej stanowi istotne globalne wyzwanie i jedno z priorytetowych zagadnień w dziedzinie ochrony zdrowia ludzkiego. Stąd wieloaspektowe monitorowanie *L. monocytogenes* jest ważnym zagadnieniem z punktu widzenia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności i zdrowia społecznego. Dlatego też należy uznać wybór tej tematyki przez Doktorantkę jako zasadny, szczególnie, że na podstawie rozporządzenia Komisji (UE) 2024/2895 z dnia 20 listopada 2024 r. zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w odniesieniu do *Listeria monocytogenes*, zaostrzono przepisy dotyczące kryteriów bezpieczeństwa żywności w przypadku tego patogenu.

Doktorantka sformułowała cel pracy jako analizę bioróżnorodności izolatów bakterii *L. monocytogenes* pochodzących z surowców, produktów i środowiska przemysłu mięsnego w kontekście ich wrażliwości na chlorek benzalkoniowy. Ponadto sformułowała następujące cele szczegółowe systematyzujące i porządkujące schemat badawczy:

1. Stworzenie kolekcji izolatów bakterii *L. monocytogenes*.
2. Analiza różnorodności genoserotypów izolatów *L. monocytogenes*.
3. Analiza oporności izolatów *L. monocytogenes* na antybiotyki.
4. Analiza aktywności beta-hemolitycznej izolatów *L. monocytogenes*.
5. Analiza występowania w genomach izolatów *L. monocytogenes* wybranych genów warunkujących wirulencję.
6. Analiza różnic we wrażliwości izolatów na chlorek benzalkoniowy.
7. Analiza obecności wybranych genów warunkujących oporność na IV-rzędowe sole amoniowe w genomach izolatów.

Chciałabym zwrócić uwagę, że sformułowanie „izolatów *Listeria monocytogenes* pochodzących z przemysłu mięsnego” zawarte w tytule rozprawy doktorskiej i przewijające się w całym polskojęzycznym komentarzu, jest co najmniej niezręczne językowo.

Doktorantka postawiła trzy hipotezy badawcze, które zweryfikowała na podstawie swoich oryginalnych badań.

W pierwszym etapie badań Doktorantka zidentyfikowała, wykorzystując dwie niezależne techniki: RFLP-PCR oraz multiplex PCR, kilkaset izolatów z rodzaju *Listeria*, a zabezpieczając je wraz

z wyizolowanym z nich DNA, stworzyła niezwykle cenną Kolekcję. Następnie dla izolatów o potwierdzonej przynależności do gatunku *L. monocytogenes* przeprowadziła analizę różnorodności genetycznej z wykorzystaniem techniki RAPD-PCR zawężając pulę izolatów do 153.

W pierwszej publikacji (Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2022, 29, 2 (131), 34 – 44) Doktorantka zaprezentowała wyniki dotyczące genoserotypowania 153 izolatów *L. monocytogenes*. Zastosowała w tym celu dwa uzupełniające się protokoły - uznaną już powszechnie metodykę wg Dumith i in., 2004 oraz metodykę opublikowaną w 2020 roku przez Feng i in. Takie podejście umożliwiało klasyfikację czterech głównych, w aspekcie klinicznym, serotypów *L. monocytogenes* (4b, 1/2a, 1/2b, 1/2c) do czterech różnych serogrup oraz wyróżnienie hiperwirulentnego serotypu 4h do osobnej serogrupy.

Opisując w metodyce tej publikacji mikroorganizmy wykorzystane do badań Doktorantka podała, że izolaty pochodziły zarówno z produktów surowych jak i przetworzonych oraz, że izolaty ze środowiska produkcji pochodziły zarówno z powierzchni kontaktujących się z żywnością jak i takich które tego kontaktu nie miały. Szkoda, że ten podział nie został utrzymany przy przedstawianiu wyników. Brakuje również informacji czy izolaty pochodziły z obszaru całego kraju czy były ograniczone np. do jednego województwa. Chciałabym również zwrócić uwagę na nieprecyzyjne opisy próbek z których pochodziły izolaty. Przez boczek możemy rozumieć zarówno część tuszy wieprzowej jak i wykonaną z niego wędzonkę czy boczek pieczony. Podobnie wołowina czy wieprzowina. Czy były surowe czy przetworzone?. Nie wiemy również z ilu zakładów izolowano szczepy. Ponieważ analiza genoserotypów może umożliwić śledzenie źródeł zanieczyszczeń pojawiających się w zakładach przetwórstwa spożywczego, szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o analizę wyników genoserotypowania pod tym właśnie kątem co zwiększyłoby aplikacyjny charakter wyników badań.

Druga publikacja w zbiorze (Life, 2023, 13, 821) została poświęcona zagadnieniu antybiotykooporności izolatów *L. monocytogenes*, szczególnie na antybiotyki powszechnie wykorzystywane w leczeniu infekcji spowodowanych *L. monocytogenes*. Badane 153 izolaty wykazywały wrażliwość na 9 antybiotyków; jedynie w przypadku cyprofloksacyny, 10 izolatów z badanej puli charakteryzowało się wielkością stref zahamowania sklasyfikowanych jako wrażliwość pośrednia pomiędzy wrażliwością a opornością. Izolatów opornych na jakikolwiek z badanych antybiotyków nie stwierdzono. Izolaty te pochodziły ze środowiska produkcji i wszystkie posiadały genoserotyp VIb. Ich profile uzyskane w badaniach RAPD-PCR i REP-PCR były zbliżone, a analiza filogenetyczna wskazuje na duże podobieństwo. Szkoda jednak, że nie przedstawiono informacji czy izolaty pochodziły z jednego zakładu produkcyjnego czy z różnych.

W publikacji tej Doktorantka zwróciła uwagę, że pomimo metodyk rekomendowanych przez CLSI i EUCAST w licznych badaniach dotyczących antybiotykooporności, badacze stosują różne metody, różne pożywki i różne warunki inkubacji oraz różne szczepy kontrolne i różne kryteria. Doktorantka także dokonała własnych wyborów w zakresie metodyki, przyjęła kryteria i podała wielkości stref zahamowania wzrostu, co pozwala na analizę wyników w ramach jej pracy natomiast nie pozwala to na porównanie w sposób uprawniony z wynikami innych badaczy. Dodatkowo chciałabym zwrócić uwagę, że w dyskusji w publikacji pierwszej i drugiej pominięto wyniki badań zespołów NIZP-PZH i Uniwersytetu Warszawskiego obejmujące zagadnienia genoserotypowania

i antybiotykooporności szczepów *L. monocytogenes* pochodzących z żywności i środowiska jej produkcji w Polsce, co mogło wzbogacić przeprowadzoną dyskusję wyników [Przykładowo (1) Korsak, D. i in., (2012). Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland, *International Journal of Food Microbiology*, 33, 304 203–208.; (2) Maćkiw E. i in., Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ready - to - eat products in Poland in 2007- 2011, *Food Control* (2015), doi: 10.1016/j.foodcont.2015.05.011].

Trzecia publikacja ze zbioru (*Microorganisms*, 2022, 10, 483) dotyczy występowania niehemolitycznych szczepów *L. monocytogenes*, przyczyn pojawiania się takiego nietypowego fenotypu oraz metod służących do oceny zdolności hemolitycznych u izolatów z tego gatunku. Aktywność beta-hemolityczna jest uznawana za cechę gatunkową *L. monocytogenes* i jest jedną z cech wykorzystywanych w identyfikacji tego gatunku znormalizowaną metodą PN-EN ISO 11290-1:2017-07, stosowaną rutynowo w kontroli bezpieczeństwa żywności i pasz. Dlatego uważam, że zawarte w tej publikacji informacje mogą być bardzo przydatne dla zespołów odpowiedzialnych za bezpieczeństwo w zakładach przetwórstwa spożywczego.

W badaniach aktywności beta-hemolitycznej szczepów *Listeria monocytogenes* Doktorantka zastosowała jako kontrolę pozytywną szczep *Listeria ivanovii* ATCC 19119 a następnie w publikacji stwierdziła, że nie rekomenduje stosowania tego szczepu. W obszarze badań mikrobiologicznych żywności funkcjonują znormalizowane metody, w tym norma PN-EN ISO 11133:2014-07 (Mikrobiologia żywności, pasz i wody -- Przygotowanie, produkcja, przechowywanie i przeprowadzanie badań pożywek), która zaleca szczep *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 jako kontrolny do oceny beta hemolizy. W świetle tego nasuwa się ogólna uwaga, że w kształceniu studentów i doktorantów w obszarze mikrobiologii żywności poświęca się zbyt małą uwagę zagadnieniom normalizacji metod badawczych.

Wyniki badań aktywności beta-hemolitycznej badanych 153 izolatów zostały włączone do publikacji czwartej (*Pathogens*, 2024, 13, 444) w której zaprezentowano wyniki badania obecności kluczowych genów warunkujących wirulencję. Dziesięć genów zostało zidentyfikowanych u wszystkich 153 izolatów *Listeria monocytogenes*. Gen *actA* wykazał polimorfizm w analizowanej grupie izolatów, a jego detekcja z użyciem dwóch par starterów pozwoliła na wyróżnienie czterech grup izolatów niezależnych od genoserotypów. Dwa izolaty różniły się od pozostałej puli z powodu delecji w sekwencji genu *inlB*. Gen *flaA* został wykryty u 113 izolatów charakteryzujących się genoserotypem IIa. Genem różnicującym zebrane izolaty w kontekście obecności genów warunkujących wirulencję był *ilsA*. Został on wykryty jedynie u 18 izolatów. Pomimo iż nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków o potencjalnie większej lub mniejszej wirulencji izolatów posiadających wydłużony lub skrócony wariant genu *actA* oraz delecję w genie *inlB* to przeprowadzone badania mają ogromny walor poznawczy i dostarczają informacji o różnorodności badanej puli izolatów *L. monocytogenes*.

W piątej publikacji (*Antibiotics*, 2024, 13, 749) Doktorantka zaprezentowała wyniki dotyczące oporności na IV-rzędowe sole amoniowe łącząc wyniki badań molekularnych dotyczących obecności trzech wybranych genów warunkujących tą oporność z wynikami analizy fenotypowej.

Potwierdzono statystycznie istotną zależność pomiędzy występowaniem w genomach co najmniej jednego z badanych genów warunkujących oporność na IV-rzędowe sole amoniowe (*emrC* lub *bcrABC* lub *qacH*) a wrażliwością na chlorek benzalkoniowy. Najczęściej występującym genem oporności był gen *emrC* obecny w genomach blisko 42% izolatów z badanej puli. Gen *bcrABC* był obecny w genomach sześciu izolatów (3,9%), a *qacH* został wykryty w jednym przypadku (0,7%). Dwa izolaty pochodzące ze środowiska produkcji miały po dwa geny warunkujące oporność. U 54,9% izolatów z kolekcji nie wykryto żadnego spośród badanych genów warunkujących oporność na IV-rzędowe sole amoniowe.

Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do pytania dlaczego w badaniu oporności izolatów zastosowała stężenie chlorku benzalkoniowego wielokrotnie przewyższające stężenia stosowane przez innych badaczy w opublikowanych badaniach.

W wyniku analizy zależności pomiędzy zbadanymi w pracy cechami Doktorantka stwierdziła, że:

- izolaty o obniżonej wrażliwości na chlorek benzalkoniowy wykazywały obniżoną wrażliwość na cyprofloksacynę statystycznie istotnie częściej niż izolaty o standardowej wrażliwości;
- izolaty posiadające gen *ilsA* statystycznie rzadziej posiadają geny warunkujące oporność na IV-rzędowe sole amoniowe, niż izolaty nieposiadające *ilsA*;
- nie zaobserwowano statystycznej zależności między występowaniem genu *ilsA* a wrażliwością na chlorek benzalkoniowy (określoną fenotypowo);
- wrażliwość na chlorek benzalkoniowy nie była zależna od genoserotypu izolatu;
- izolaty posiadające gen *ilsA* wykazały obniżoną wrażliwość na cyprofloksacynę statystycznie istotnie częściej, niż izolaty nieposiadające tego genu.

Przedłożoną do recenzji rozprawę mgr inż. Iwony Marii Kawackiej przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej potwierdzonej publikacjami wyników w czasopiśmie naukowym o znaczącym współczynniku wpływu. Jest ona opracowaniem oryginalnym i przedstawia wyniki dokumentujące realizację założonych celów i weryfikujące postawione hipotezy badawcze. Na uwagę zasługuje umiejętne połączenie badań molekularnych analizy obecności genów odpowiedzialnych za wirulencję oraz za oporność na IV-rzędowe sole amoniowe z charakterystyką fenotypową izolatów *L. monocytogenes*. Uzyskane wyniki uzupełniają obraz bioróżnorodności i pozwalają na śledzenie trendów zmian zachodzących wśród izolatów *L. monocytogenes*. Dodatkowo należy zwrócić uwagę na umiejętność analizy i interpretacji wyników oraz ich dyskusji przez Doktorantkę.

Stwierdzam, że zbiór artykułów pod wspólnym tytułem: **Analiza bioróżnorodności izolatów bakterii *Listeria monocytogenes* pochodzących z przemysłu mięsnego w kontekście ich wrażliwości na chlorek benzalkoniowy**, przedstawiona przez Panią mgr inż. Iwonę Marię Kawacką jest nowością i ma znaczący wkład w dyscyplinę naukową technologia żywności i żywienia. Uważam, że spełnia ona wymagania stawiane rozprawom dyplomowym na stopień doktora określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.

U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Iwony Marii Kawackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

