

dr hab. Anna Rymuszka

Lublin, 20.08.2018r.

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku

Katedra Fizjologii Zwierząt i Toksykologii

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**Pani mgr Natalii Walczak pt.: Oporność na tetracykliny u bakterii  
izolowanych od chorych ryb akwariowych**

**wykonanej w Zakładzie Chorób Ryb i Biologii, na Wydziale Medycyny  
Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
pod kierunkiem promotora dr hab. Leszka Guza i promotora  
pomocniczego dr Sebastiana Gnata**

Występowanie lekooporności w odniesieniu do bakterii chorobotwórczych, jest istotnym problemem zdrowotnym zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej. Przyczyną rozwoju tego zjawiska jest głównie nieuzasadnione lub niewłaściwe stosowanie antybiotyków w terapii chorób, czy też wykorzystywanie ich w chowie zwierząt, jako promotorów wzrostu. Oporność bakterii na antybiotyki prowadzi do osłabienia ich skuteczności terapeutycznej, niesie za sobą konieczność podawania większych dawek leku, jak również zmusza do poszukiwania nowych związków leczniczych. Infekcje powodowane przez chorobotwórcze drobnoustroje są przyczyną dużych strat ekonomicznych, które nie tylko prowadzą się do wzrostu kosztów opieki zdrowotnej. Konsekwencje narastania lekooporności dotyczą różnych innych dziedzin i sektorów m.in. produkcji zwierzęcej, rolnictwa, przemysłu spożywczego, handlu, czy ochrony środowiska. Problem ten jest także widoczny i od kilku lat intensywnie badany w akwakulturze. W tym świetle badania Doktorantki wpisują się w nurt aktualnie prowadzonych prac naukowych.

Uwzględniając skalę importu ryb akwariowych, a przede wszystkim wzięwszy pod uwagę tzw. „plastyczność genetyczną” bakterii, związaną z horyzontalnym transferem genów, ryby akwariowe mogą stanowić rezerwuwar patogennych bakterii zarówno dla człowieka, jak i innych zwierząt. Warto nadmienić, że monitorowanie występowania chorób zakaźnych w środowisku wodnym oraz badania zjawiska oporności patogenów na stosowane antybiotyki, odnoszą się i związane są z leczeniem przede wszystkim ryb konsumpcyjnych. Lekooporność zidentyfikowanych u ryb akwariowych chorobotwórczych bakterii na tetracyklinowe antybiotyki, nie była według Doktorantki, jak i wiedzy Recenzenta do chwili obecnej analizowana, stąd uzyskane wyniki są bez wątpienia istotne poznawczo.

Rozprawa mgr Natalii Walczak ma typowy układ. Napisana jest poprawnym językiem naukowym. Całość obejmuje 116 stron, na których zamieszczono: Wstęp, poprzedzony Alfabetycznym Wykazem Skrótów, Cel Pracy, Materiał i Metody, Wyniki Badań, Dyskusję, Wnioski, Streszczenie w języku polskim oraz angielskim, Literaturę (237 pozycji), 12 kolorowych Rycin, 37 Tabel oraz Suplement zawierający sekwencje analizowanych fragmentów badanych genów oporności na tetracykliny (*tet*).

We wstępie Doktorantka wyczerpująco przedstawia choroby ryb akwariowych, wywoływane przez bakterie zarówno Gram-ujemne z rodzaju m.in. *Aeromonas*, *Shewanella*, *Citrobacter*, jak i Gram-dodatnie np. *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptococcus*. Rzeczowo omawia kwestię leczenia ich tetracyklinami oraz wprowadza w tematykę związaną z molekularnymi podstawami oporności bakterii oraz mechanizmami warunkującymi niewrażliwość drobnoustrojów na antybiotyki. Charakteryzuje ponadto, związki dezynfekcyjne stosowane w akwarystyce, które z uwagi na potencjalną aktywność przeciwbakteryjną, a niekiedy przeciwwirusową oraz przeciwgrzybiczą mogą być stosowane do leczenia ryb.

Treści i sposób opracowania tej części pracy doktorskiej, świadczą o bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę zagadnień odnoszących się do obszaru rozprawy. Pozwoliło to bez wątpienia na klarowne sformułowanie

głównego celu badań, jakim było zbadanie oporności na tetracykliny bakterii wyizolowanych od chorych ryb akwariowych.

Rozdział „Materiał i Metody” w sposób syntetyczny, ale jednocześnie przystępny przedstawia zakres wykonanych prac i zastosowanych klasycznych, jak i nowoczesnych technik badawczych. Poszczególne etapy i zadania badawcze zostały jasno zdefiniowane oraz poprawnie pod względem metodycznym zaplanowane i zrealizowane. Do badań użyto 240 izolatów różnych gatunków bakterii, pozyskanych od 123 ryb akwariowych. Identyfikację gatunkową szczepów przeprowadzono wykorzystując nowoczesną technikę spektrometrii mas MOLDI-TOF. W dalszej kolejności materiał genetyczny bakterii posłużył do reakcji amplifikacji, której celem była detekcja sześciu genów oporności na tetracykliny *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE* i *tetM*. W celu potwierdzenia czy otrzymane produkty PCR są rzeczywiście fragmentami genów oporności na tetracykliny, zlecono wykonanie sekwencjonowania wybranych fragmentów DNA. Następnie określono wartość minimalnych stężeń hamujących (MIC) wybranych tetracyklin oraz związków dezynfekcyjnych stosowanych w akwarystyce, a klasyczną metodą dyfuzyjno - krążkową oznaczono wrażliwość tetracyklinoopornych izolatów na antybiotyki inne, niż tetracykliny m.in. amikacynę, chloramfenikol, ciprofloksacynę, gentamycynę. Warto podkreślić szeroki zakres wykonanych prac, co pozwoliło Doktorantce na zdobycie i opanowanie cennych umiejętności praktycznych oraz warsztatu badawczego.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób klarowny i syntetyczny. Bez wątplenią jest to zasługą dobrze przemyślanych, starannie zredagowanych i wyczerpująco opisanych rycin oraz tabel. Przy dużej liczbie różnego rodzaju analiz, a co za tym idzie uzyskanych wyników, ich opracowanie z pewnością nie było łatwe.

Wobec obszernego zakresu zgromadzonych danych, zawarta w rozprawie Dyskusja jest wielowątkowa. Jej poprowadzenie wymagało od mgr Natalii Walczak dobrego przygotowania, dużej orientacji w różnych zagadnieniach badawczych. Autorka unikając zbędnej spekulacji, omawia otrzymane wyniki na tle dostępnej literatury. Rzeczowo komentuje

zaobserwowane efekty i podaje ich interpretację. Wyciągnięte wnioski są jak najbardziej uprawnione i logiczne. Stanowią zasadne podsumowanie oryginalnych obserwacji Doktorantki.

Analiza przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej nasunęła mi kilka spostrzeżeń i uwag.

Tytuł pracy, który brzmi „Oporność na tetracykliny u bakterii izolowanych od chorych ryb akwariowych” odnosi się jedynie do celu głównego i nie w pełni oddaje całość treści osiągnięcia naukowego.

W mojej ocenie Doktorantka oprócz celu podstawowego powinna była jasno nakreślić i sformułować cele szczegółowe, co byłoby znacznie bardziej czytelne dla całości odbioru rozprawy. Pozwoliłoby to ponadto, bardziej uwydatnić wszystkie wykonane analizy i uzyskane wyniki badań, które mają dużą wartość poznawczą, a przede wszystkim praktyczną.

W części odnośnie wyników pojawiły się drobne błędy np. w opisie i analizie danych odnośnie wrażliwości szczepów *Aeromonas* na tetracykliny (str. 52).

W dyskusji spotkać można powtórzenia treści, które znalazły się we wstępie, chociażby informacja odnośnie daty zaobserwowania oporności gatunku *Shigella dysenteriae* na tetracyklinę (przy czym we wstępie Doktorantka pisze iż było to w roku 1953, a w dyskusji podany jest rok 1954).

Alfabetyczny wykaz skrótów jest niepełny. W tekście rozprawy znaleźć można wiele skrótów, których brak w wykazie np. ze str. 14, 18. Autorka winna się ponadto wystrzegać wielokrotnego ich opisu, naprzemiennego ich używania z pełnymi nazwami. Ponadto, skrót w tekście winien się pojawić przy pierwszym użyciu pełnej nazwy do której się odnosi, a nie dowolnie.

Tekst jest napisany poprawną polszczyzną, niemniej jednak Autorka nie uniknęła drobnych potknięć natury redakcyjnej: interpunkcja, literówki (np. str. 16, 17, 21, 29). Nieścisłości wkradły się również w cytowaniu odnośników literaturowych (poz. 201, str.71; poz.208, str.73) oraz do zapisu pozycji literaturowych (niekiedy brak zapisu rodzaju i gatunku bakterii

kursywą np. w pozycji literaturowej nr 17). Ponadto, nie wszystkie zamieszczone w spisie literatury pozycje mają swój odnośnik w treści pracy. Te drobne potknięcia nie umniejszają jednak mojej wysokiej oceny poprawności redakcyjnej rozprawy.

### **Podsumowanie**

Dysertacja Pani mgr Natalii Walczak jest wartościowym opracowaniem naukowym, posiada walory oryginalności i przyczynia się do poszerzenia wiedzy z zakresu badania zjawiska narastającej lekooporności bakterii na antybiotyki w akwakulturze, a zwłaszcza akwarystyce.

W mojej opinii przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie metodologiczne, strukturalne i merytoryczne kryteria stawiane pracom na stopień naukowy doktora określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Przeto z pełnym przekonaniem **wnioskuję do Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Natalii Walczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Biorąc pod uwagę kompleksowość przeprowadzonych badań, a nade wszystko wartość merytoryczną uzyskanych wyników, wnoszę o przyznanie stosownego wyróżnienia.

