

dr hab. Ewa Korzeniewska, prof. UWM
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Nauk o Środowisku
UWM w Olsztynie

R e c e n z j a

pracy doktorskiej mgr Nicoletty Makowskiej pt. „Geny integraz i oporności na antybiotyki β -laktamowe i glikopeptydowe rezystomu ścieków miejskich”, wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod opieką naukową dr hab. Joanny Mokrackiej, prof. UAM

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Nicoletty Makowskiej prezentuje wyniki badań, których celem była jakościowa i ilościowa analiza rezystomu ścieków miejskich Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach koło Poznania.

Tematyka badawcza jest bardzo interesująca i wnosi nowe informacje do mikrobiologii środowiskowej związane z rodzajem i częstością występowania genów integrazy oraz genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe i glikopeptydowe w genomach mikroorganizmów hodowlanych bytujących w ściekach oraz w metagenomie ścieków. Stan wiedzy na temat drobnoustrojów bytujących w ściekach i roli rezystomu oczyszczalni ścieków w rozprzestrzenianiu się lekooporności w rezystomie środowiskowym jest ciągle fragmentaryczny. Stąd też bardzo cenne są wyniki badań uzyskane przez panią mgr Nicolettę Makowską.

Otrzymana do recenzji dysertacja doktorska posiada typowy układ dla opracowań na stopień naukowy. Napisana jest ona poprawnym językiem naukowym z prawidłowym użyciem nazewnictwa specjalistycznego. Tekst przedstawionej pracy mieści się na 216 stronach, z czego załączniki stanowią 16 stron.

Rozpoczyna ją **Wstęp** wraz z częścią literaturową obejmujący 30 stron i zawierający wprowadzenie w zagadnienia roli i znaczenia zjawiska antybiotykoodporności mikroorganizmów w środowisku, dróg i mechanizmów jego rozprzestrzeniania, oraz roli integronów w transferze genów lekooporności pomiędzy drobnoustrojami ściekowymi i środowiskowymi. W tej części pracy Autorka

charakteryzuje również najistotniejsze grupy drobnoustrojów wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), cefalosporiny, karbapenemy, enzymy odpowiedzialne za oporność na metycylinę (MRSA) i wankomycynę (VRE) oraz najistotniejsze genetyczne determinanty lekooporności tych mikroorganizmów. Rozdział ten jest zwięzłą, logiczną i dobrze skomponowaną częścią pracy, co wskazuje na dobrą znajomość badanych zagadnień i piśmiennictwa z tego zakresu. Autorka w przekonujący sposób uzasadnia również potrzebę podjęcia badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Drugą część pracy stanowi część badawcza obejmująca **Cel i zakres pracy**, hipotezy i zadania badawcze, schemat prowadzenia badań laboratoryjnych, charakterystykę poszczególnych etapów badań oraz opis uzyskanych wyników i ich interpretację. Rozdział **Metody i materiały** jest prawidłowo skomponowanym elementem pracy, w którym przedstawiono w sposób czytelny na 39 stronach zarówno charakterystykę miejsc poboru materiału biologicznego do badań (Oczyszczalnia Ścieków w Koziegłowach koło Poznania), sposób izolacji i identyfikacji czystych kultur, metodykę oznaczania ich fenotypowej lekooporności oraz analizę składu populacji mikroorganizmów występujących w ściekach oraz jakościową i ilościową ocenę genetycznych determinantów lekooporności rezystomu ściekowego. W rozdziale tym Autorka pracy w sposób szczegółowy i kompletny scharakteryzowała sposób identyfikacji badanych mikroorganizmów z wykorzystaniem zarówno metod klasycznych, jak też metod molekularnych opartych na sekwencji wybranych fragmentów genomu bakteryjnego. Zastosowane metody analiz statystycznych wydają się prawidłowe i pomocne w zweryfikowaniu hipotez badawczych przedstawionych w dysertacji. Ta część pracy jest napisana w sposób jasny i zrozumiały. Opis metod badawczych nie budzi zastrzeżeń, zostały one prawidłowo wybrane i zastosowane.

W zakres części badawczej pracy wchodzi również rozdział **Wyniki** stanowiący przejrzysty opis uzyskanych przez Doktorantkę wyników przeprowadzonych analiz. Obejmuje on zarówno wyniki analiz mikrobiologicznych określających liczebność drobnoustrojów heterotroficznych i lekoopornych w ściekach dopływających, z komory napowietrzania oraz ściekach odpływających, bioróżnorodność populacji bakterii w ściekach i identyfikację szczepów w nich dominujących, jak też wyniki

analiz fizyko-chemicznych ścieków. Wyniki te przedstawione zostały na 94 stronach. Zestawienie obejmuje 28 tabel oraz 47 kolorowych opracowań graficznych. Tabele i rysunki są czytelne i przygotowane bardzo starannie. Ta część pracy jest skomponowana przejrzysto, wyniki są zreferowane szczegółowo i w sposób uporządkowany. Uzupełnieniem tego rozdziału pracy są szczegółowe informacje dotyczące podobieństw genetycznych poszczególnych grup bakterii lekoopornych wyizolowanych ze ścieków w postaci dendrogramów zawarte w 16 załącznikach na stronach 203-2016.

Czwartym rozdziałem części badawczej pracy jest rozdział **Dyskusja wyników**. Rozdział ten obejmuje 17 stron maszynopisu. Autorka podjęła się tutaj próby oceny uzyskanych wyników badań własnych na tle dostępnej literatury światowej. Autorka ustosunkowuje się do rezultatów swoich badań, porównując i konfrontując je z danymi literaturowymi, wykazując przy tym dużą ostrożność interpretacyjną w odniesieniu do zebranych wyników, co dowodzi dojrzałości Autorki jako badacza.

Pracę kończą podrozdziały **Podsumowanie** oraz **Wnioski**. Dobra znajomość literatury przedmiotu oraz umiejętność wyważonej oceny znaczenia uzyskanych wyników umożliwiły wnikliwe podsumowanie pracy oraz sformułowanie 8 wniosków, które w pełni odzwierciedlają analizę uzyskanych wyników badań. Należałoby jednakże usunąć dwa pierwsze zdania sekcji **Podsumowania**, albowiem z uwagi na fakt, iż nie prowadzono badań zarówno ścieków szpitalnych dopływających do oczyszczalni, jak również wody rzeki Warty przed i za dopływem ścieków oczyszczonych, stwierdzenia te nie odzwierciedlają zakresu badań prowadzonych w ramach przedstawionej do oceny pracy.

Cytowana **Literatura** zamyka się liczbą 294 pozycji, w tym ponad 20% prac wydanych po 2015 roku. Dobór bogatego oraz w głównej mierze najnowszego piśmiennictwa zarówno anglo- jak i polsko- języcznego, wskazuje na dużą dojrzałość naukową Autorki i umiejętność wykorzystania literatury źródłowej.

Po pełnej analizie pracy nasuwa się kilka uwag. Nie traktowałabym ich jedynie jako uwagi krytyczne, ale jako propozycje do rozważenia w dalszych badaniach.

Wskazanim byłaby korekta nazewnictwa ścieków w tekście całej dysertacji. W obowiązującej nomenklaturze nie istnieją wyrażenia w liczbie pojedynczej odnoszące się do ścieków, takie jak: „ściek surowy”, „ściek z komory napowietrzania” oraz „ściek odpływający”. Powszechnie przyjętymi pojęciami są: „ścieki dopływające” wymiennie na „ścieki nieoczyszczone”, „ścieki z komory napowietrzania” wymiennie na „ścieki z bioreaktora” oraz „ścieki odpływające” wymiennie na „ścieki oczyszczone”. Ponadto, biorąc pod uwagę zmiany w nomenklaturze pojęć mikrobiologicznych dotyczących określania populacji drobnoustrojów zasiedlających różnego rodzaju środowiska, należałoby skorygować pojęcie „mikroflora” i zastąpić je wyrażeniem „mikrobiota”. Pojęcia „przesiewano” i „posiewano” należy zastąpić wyrażeniem „przeszczepiano”, natomiast pojęcie „wyosobniono” należy zastąpić wyrażeniem „pozyskano” lub „wyizolowano”.

W całej pracy należałoby również skorygować zapis nazw genów. Jako przykład można tu podać zapis nazw genów w **Streszczeniu** pracy: *int11*, *ampC*, *mecA* i *vanA*. Poprawny zapis nazwy genów to pierwszy człon zapisany kursywą, drugi zaś pochodzący z reguły od nazw białek zapisuje się z dużej litery nie kursywą.

Część zapisów w pracy jest niejasna i wymaga korekty. Przykładem może być stwierdzenie na str. 62 – rozdział 3.4.3 – „Reakcję uznano za prawidłową, gdy liczba kopii genu była taka sama jak wartość CFU/ml bakterii z wklonowanym fragmentem badanego genu, oznaczana metodą posiewu powierzchniowego”. Nie jest zrozumiałym przez czytelnika, co Autorka miała na myśli pisząc to zdanie?;

Autorka stosuje w tekście pracy szereg skrótów myślowych, które również wymagają korekty, np.:

- str. 40, rozdziały 3.2.3 i 3.2.4 – należałoby skorygować „Dla próbek ścieków wykonywano szereg rozcieńczeń.....” i wyrzucić wyrażenie „osadów”, których to analiz doktorantka nie prowadziła;
- str. 43 – rozdział 3.2.10 – proszę skorygować wyrażenie „Płytki inkubowano....”, zapewne Autorka miała na myśli drobnoustroje inkubowane na podłożach w płytkach;

- str. 44 – rozdział 3.2.11 – proszę skorygować wyrażenie „kolonie potencjalnych izolatów....”;
- str. 47 – rozdział 3.2.15 – proszę wyjaśnić wyrażenie „materiał z kolonii bakterii....”. Autorka powinna doprecyzować opis procedury przygotowania matrycowego DNA, zwłaszcza w przypadku izolacji DNA z komórek Gram+;
- str. 55 – rozdział 3.3.2 ostatni wiersz – proszę uściślić wyrażenie „dodawano 1 ml wody....”. Autorka powinna doprecyzować jaki rodzaj wody zastosowano. Ponadto to samo zdanie i następujące po nim zdania na str. 56 odnoszą się do izolacji metagenomowego DNA z „osadu”. Proszę o korektę powyższego zapisu. Niejasne jest też wyrażenie „supernatanty zebrano” zawarte w tych samych sekcjach tekstu;
- str. 56 – rozdział 3.3.3 – proszę skorygować wyrażenie „rozcieńczeń preparatów metagenomowego DNA”;
- str. 63 – rozdział 3.4.4 – proszę skorygować wyrażenie „frakcjonowanie próbki na poszczególne reakcje”;
- str. 77 – rozdział 4.2 – proszę skorygować wyrażenie „Największą redukcję ogólnej liczby bakterii pomiędzy ściekami nieoczyszczonymi a oczyszczonymi zaobserwowano wiosną, natomiast najniższą w trzech poborach zimowych” – Autorka zapewne miała na myśli, iż redukcja liczebności bakterii następowała w próbkach ścieków a nie w poborach;
- str. 83, 85 i 87 – rozdziały 4.6, 4.7 i 4.8 – proszę skorygować wyrażenia „Metacyliinooporne szczepy *S. aureus* wyizolowano w pięciu poborach....”, „..... *Enterococcus* oporne na wankomycynę wyizolowano w sześciu poborach.....”, „Bakterie izolowano w sześciu poborach.....”. Autorka zapewne miała na myśli, iż bakterie te wyizolowano w próbkach ścieków pobieranych w różnych sezonach badawczych a nie wyizolowano ich w poborach;
- str. 93 – proszę skorygować wyrażenie „Zaobserwowano wyższą częstość oporności na antybiotyki karbapenemowe niż ścieku z komory napowietrzania”. Identyczny skrót myślowy zastosowano w ostatnim zdaniu na

tej samej stronie oraz w kolejnym akapicie na str. 94. Czy Autorka miała na myśli, iż zaobserwowano wyższą częstość u izolatów pozyskanych ze ścieków z komory napowietrzania?;

- str. 99 – proszę skorygować wyrażenie „Zaobserwowano wzrost oporności na imipenem i meropenem w ścieku....”. Czy Autorka ma na uwadze oporność izolatów pozyskanych ze ścieków???
- str. 102 – proszę skorygować wyrażenie „średnie częstości oporności dla szczepów wytwarzających ESBLwyzolowanych ze wszystkich poborów....”;
- w całej pracy, w szczególności str. 111, 114, 116, 126, 127, 173 – proszę skorygować wyrażenia „Częstość występowania... w ... poborach....”, „wyselekcjonowano szczep z... poboru”, „nie wyosobniono izolatu.... w żadnym z poborów”, „nie odnotowano szczepów.... w poborach”, „nie odnotowano szczepów.... w sezonie wiosennym”, „...we wszystkich poborach wyizolowano...”;
- w całej pracy, w szczególności rozdział 4.19 i str. 179-180 – niepoprawnym są określenia „statystycznie istotne różnice / statystycznie istotny wzrost pomiędzy poborami, pomiędzy wiosną a latem....”, itd. Zapewne różnice dotyczą liczebności bakterii w próbkach ścieków pobieranych na różnych stanowiskach lub w różnych sezonach badawczych, dlatego też tekst pracy należy odpowiednio skorygować;

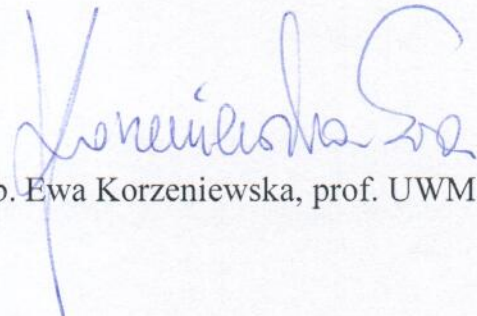
Począwszy od Tabeli 13 a kończąc na Tabeli 15 proszę o wyjaśnienie średniej liczby szczepów podanej w ostatnich 3 wierszach tabel. Jakie średnie liczby miała Autorka na uwadze? Wskazany byłoby podsumowanie liczby szczepów w danym rodzaju próbki i pokazanie ich %-ej oporności na dane antybiotyki, niewłaściwym zaś podanie średniej liczby szczepów czy też średniego % oporności.

W tekście rozprawy doktorskiej zauważono również szereg drobnych błędów edytorskich. Jednakże pozostają one bez wpływu na wartość merytoryczną pracy.

Uwagi zawarte w końcowej ocenie pracy doktorskiej mgr Nicoletty Makowskiej nie wpływają na jej pozytywną ocenę merytoryczną. Autorka wywiązała się znakomicie z realizacji podjętych obszernych zadań badawczych. Wyniki badań uważam za bardzo cenne. Pozwolą one uzupełnić luki w wiedzy na temat rodzaju i częstości występowania istotnych dla zdrowia publicznego determinantów antybiotykoodporności u bakterii zasiedlających ścieki, jak również pozwolą na określenie potencjalnego współdziału ścieków oczyszczonych w zwiększaniu różnorodności i częstości występowania genów lekooporności w rezystomie środowiskowym.

W związku z pozytywną oceną dysertacji doktorskiej przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr Nicoletty Makowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn 20.02.2019


dr hab. Ewa Korzeniewska, prof. UWM