



Katowice, 20.03.2019 r

Prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget
Katedra Mikrobiologii
40-032 Katowice
ul. Jagiellońska 28

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Nicoletty Makowskiej pt: „Geny integraz i oporności na antybiotyki β -laktamowe i glikopeptydowe rezystomu ścieków miejskich”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Nicoletty Makowskiej dotyczy niezwykle istotnego problemu obecności antybiotykoopornych bakterii w środowisku i rozprzestrzenienia się genów warunkujących oporność na antybiotyki (ARGs, *antibiotic resistance genes*). Szybkie rozprzestrzenianie się antybiotykooporności (AR, *antibiotic resistance*) wśród mikroorganizmów jest wynikiem nadużywania antybiotyków w medycynie, weterynarii i hodowli zwierząt. Pojawianie się tzw. szczepów wielolekoopornych, niewrażliwych na leki ostatniej szansy jest poważnym problemem medycznym. Problem ten ma charakter globalny, co powoduje konieczność podejmowania odpowiednich działań o zasięgu międzynarodowym.

W rozprzestrzenianiu AR istotną rolę odgrywają bakterie środowiskowe. Genomy tych bakterii stanowią swoisty rezerwuuar genów oporności na antybiotyki, które mogą być pobierane przez bakterie. Udokumentowano kluczową rolę ruchomych elementów genetycznych w nabywaniu przez patogeny nowych genów kodujących antybiotykooporność od szczepów środowiskowych.

W ostatnich latach w literaturze światowej podjęto również ożywioną dyskusję na temat roli oczyszczalni ścieków w rozprzestrzenianiu AR. Ze względu na bogactwo bakterii i ruchomych elementów genetycznych obecnych w genomach bakterii zasiedlających oczyszczalnie ścieków, zakłady te uważa się za rezerwuary bakterii antybiotykoopornych i genów kodujących mechanizmy oporności bakterii. Transfer plazmidów czy transpozonów, w połączeniu z silną presją antropogeniczną, umożliwia generowanie i selekcję szczepów wielolekoopornych, które wraz z oczyszczonymi ściekami trafiają do rzek. Określenie środowiskowego rezerwuaru bakterii opornych na antybiotyki i ARGs jawi się jako szansa na poznanie nowych mechanizmów oporności, jakie w przyszłości mogą nabyć patogeny oraz może pomóc w prognozowaniu powstawania i rozprzestrzeniania ARGs wśród bakterii.

Przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Nicoletty Makowskiej, przygotowana pod kierunkiem Pani dr hab. Joanny Mokrackiej, prof. UAM wpisuje się w nurt takich właśnie badań, realizowanych z powodzeniem w Zakładzie Mikrobiologii, na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Rozprawa została wykonana w ramach grantu uzyskanego z Narodowego Centrum Nauki w konkursie PRELUDIUM.



Przedłożona do oceny rozprawa ma układ typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych. Obejmuje 216 stron maszynopisu i zawiera 9 podstawowych rozdziałów: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, wnioski i spis literatury. Pracę uzupełnia wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz załączniki. Została przygotowana starannie pod względem językowym i edytorskim.

Pracę zaczyna 30 stronicowy wstęp, który jest interesującym i bardzo dobrze napisanym, przeglądem literatury. W pierwszych częściach tego rozdziału Doktorantka definiuje oporność bakterii na antybiotyki oraz przedstawia procesy warunkujące utrzymywanie i rozprzestrzenianie się antybiotykooporności wśród mikroorganizmów. Zwraca uwagę, że w badaniach tych zjawisk niezbędne jest podejście metagenomiczne. To właśnie metagenomika umożliwia ocenę rzeczywistego zróżnicowania genetycznego w populacjach bakterii, poznanie całkowitego rezerwuaru genów oporności na antybiotyki w badanym środowisku oraz odkrycie nowych genów bez konieczności hodowli mikroorganizmów w warunkach laboratoryjnych. W dalszej części przeglądu Doktorantka przedstawiła rolę oczyszczalni ścieków w selekcji szczepów antybiotykoopornych oraz ich rozprzestrzenianiu. Pani mgr Makowska wyczerpująco opisała również bakteryjne mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe oraz przedstawiła budowę i klasyfikację β -laktamaz, enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę pierścienia β -laktamowego i tym samym inaktywację β -laktamów. Teoretyczny wstęp kończy charakterystyka bakterii stanowiących ważny problem kliniczny – bakterii *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA) oraz bakterii z rodzaju *Enterococcus* opornych na wankomycynę (VRE).

W mojej ocenie zaprezentowany przegląd literatury stanowi logiczną i spójną całość. Został napisany przejrzysto i zawiera wszystkie informacje niezbędne do interpretacji uzyskanych wyników.

Przedstawione podstawy teoretyczne są bardzo dobrym wprowadzeniem do celu pracy, którym była jakościowa i ilościowa analiza rezystomu ścieków pobieranych w sumie 8 razy (od marca 2015 r. do stycznia 2017 r.) z osadnika wstępnego, kanału wylotowego i komory napowietrzania Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach. W ramach pracy doktorskiej Autorka badała częstość występowania aż 13 genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe i karbapenemowe (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{GES}, *bla*_{CVIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{DHA}, *bla*_{CMY}, *ampC* i *mecA*) oraz glikopeptyd wankomycynę (*vanA*) w genomach hodowalnej frakcji bakterii oraz metagenomie ścieków. Ponadto, w genomach wybranych bakterii wykrywała geny trzech klas integraz (*int1*, *int2*, *int3*), a w metagenomie ścieków określała częstość występowania genów integrazy integronów klasy 1, która spośród trzech klas integronów zaangażowanych w rozprzestrzenianie ARGs, jest najczęściej identyfikowana u antybiotykoopornych bakterii. W rozdziale „cel pracy” Autorka skupiła się na rezystomie ścieków, ale w pracy przedstawiła (i dyskutowała) również wyniki dotyczące ogólnej liczby bakterii heterotroficznych, bakterii grupy coli, bakterii *Staphylococcus aureus* i bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Informacja o tych analizach też powinna być w tym rozdziale zamieszczona.



Doktorantka postawiła kilka hipotez badawczych, które weryfikowała w logicznie zaplanowanych i konsekwentnie realizowanych zadaniach badawczych obejmujących kolejno: (1) izolację i identyfikację bakterii wytwarzających β -laktamazy o poszerzonym spektrum substratowym (ESBL, *extended spectrum β -lactamase*), karbapenemazy oraz szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus* opornych na wankomycynę i bakterii *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA), (2) określenie wariantów genów oporności na antybiotyki u bakterii hodowlanych, (3) wyznaczenie liczby kopii i częstości występowania genów oporności na antybiotyki i integraz integronów klasy I w metagenomie ścieku oraz (4) oznaczenie różnorodności genetycznej w metagenomie ścieków na poszczególnych etapach ich oczyszczania. Biorąc pod uwagę fakt, że nasza wiedza na temat zjawiska antybiotykooporności w środowisku naturalnym jest wciąż niewielka, podjęcie tej tematyki badawczej uważam za bardzo uzasadnione.

Do realizacji postawionych celów pracy Pani mgr Nicoletta Makowska wykorzystała szereg metod badawczych obejmujących zarówno tradycyjne metody stosowane w mikrobiologii do oceny liczebności bakterii, izolacji i hodowli mikroorganizmów, oznaczania wrażliwości i oporności bakterii na antybiotyki, zdolności bakterii do wytwarzania β -laktamaz, jak i szereg metod biologii molekularnej. Te ostatnie Doktorantka wykorzystywała do określenia polimorfizmu genetycznego wyizolowanych szczepów bakterii (ERIC-PCR), wykrywania genów integraz, detekcji genów kodujących oporność na wankomycynę i metycylinę, identyfikacji genów kodujących β -laktamazy, cefalosporynazy i karbapenemazy oraz wariantów badanych genów (PCR). Z wykorzystaniem real-time PCR (qPCR) Doktorantka oznaczyła liczbę kopii genu 16S rDNA oraz genów oporności na antybiotyki β -laktamowe i glikopeptydowe w metagenomowym DNA. Za bardzo ważne uważam analizy zróżnicowania filogenetycznego bakterii w badanych ściekach przeprowadzone metodą sekwencjonowania nowej generacji. Zastosowanie podejścia metagenomicznego przyniosło dużą ilość informacji, które przedstawiono w syntetyczny sposób. Doktorantka dobrze poradziła sobie z przeprowadzeniem szeregu analiz bioinformatycznych obejmujących ocenę bioróżnorodności bakterii oraz analizę podobieństwa genetycznego bakterii w próbkach pobranych na różnych etapach oczyszczania ścieków. Wszystkie przeprowadzone procedury zostały dokładnie opisane

Biorąc pod uwagę różnorodność i bardzo duży zakres badań niezwykle wysoko oceniam wysiłek Doktorantki włożony w realizację zaplanowanych doświadczeń.

Szeroko zakrojone badania zaowocowały dużą ilością wyników, które Pani mgr Makowska przedstawiła w sumie na 93 stronach pracy, zestawiając je w 27 tabelach i 46 rycinach. Wyniki zaprezentowane są w sposób czytelny i przejrzysty, zostały one ponadto zanalizowane przy pomocy odpowiednich metod statystycznych. Szkoda jednak, że Doktorantka nie zaznaczyła bezpośrednio na wykresach przedstawiających liczbę badanych bakterii, które z obserwowanych różnic są statystycznie istotne. Uważam ponadto, że analiza statystyczna wyników powinna być zamieszczona w odpowiednich rozdziałach (przy prezentowanych wynikach), a nie zebrana w oddzielny rozdział.

Mam uwagę do tytułów rycin 54 – 57. Przedstawione diagramy przedstawiają procentowy udział określonych taksonów bakterii w badanym zespole bakterii, a nie procentową zawartość liczby odczytów sekwencji genów 16S rRNA w metagenomie ścieków. Można też powiedzieć, że



przedstawiają procentową zawartość odczytów sekwencji 16S rRNA odpowiadających określonym taksonom.

Do najważniejszych wyników pracy doktorskiej mgr Nicoletty Makowskiej zaliczam:

1. udokumentowanie, że antybiotykooporne, potencjalnie patogenne bakterie oraz ARGs dostają się z oczyszczonymi ściekami do wody powierzchniowej. Doktorantka wykazała, że w ścieku oczyszczonym obecne są bakterie, u których zidentyfikowano gen *bla*_{CTX-M-15}, warunkujący wytwarzanie ESBL i geny kilku karbapenemaz (*bla*_{NDM}, *bla*_{CVIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}), a także entrokoki odporne na wankomycynę i metycylineooporne bakterie *S. aureus*;
2. wykazanie, że procesy selekcji i horyzontalnego transferu genów zachodzące w trakcie procesów oczyszczania prowadzą do zwiększenia częstości występowania antybiotykoopornych bakterii i genów: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48} i *mecA* w ścieku oczyszczonym oraz zwiększenia częstości występowania integronów klasy I w rezystomie komory napowietrzania;
3. opisanie różnic w składzie taksonomicznym bakterii zasiedlających ścieki pobrane na różnych etapach ich oczyszczania oraz wykazanie zwiększenia zróżnicowania genetycznego bakterii w ścieku oczyszczonym w porównaniu do ścieku surowego i komory napowietrzania.

Pani mgr Makowska uzyskała wiele interesujących wyników, istotnych zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia. Wyniki te wpisują się w światową dyskusję nad koniecznością opracowania skutecznych strategii eliminujących antybiotykooporne bakterie i geny oporności w procesach oczyszczania ścieków. Uważam, że badania losów ARGs powinny być prowadzone w ramach monitoringu środowisk wodnych, szczególnie rzek, do których odprowadzane są oczyszczone ścieki będące rezerwuarem bakterii antybiotykoopornych i potencjalnie patogennych.

W kolejnym rozdziale „Dyskusja” Pani mgr Nicoletta Makowska przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników według postawionych sobie celów. Dyskusja jest jednocześnie rzeczowym omówieniem wyników i w każdym punkcie jest odniesiona do wyników - często odmiennych - uzyskanych przez innych badaczy. Rozdział ten dokumentuje dojrzałość naukową doktorantki, pokazuje ponadto, (jak również przegląd literatury), że Pani mgr Nicoletta Makowska bardzo swobodnie porusza się w światowej literaturze dotyczącej obecności bakterii opornych na antybiotyki w środowisku oraz dróg rozprzestrzenienia ARGs i antybiotykoopornych bakterii.

Dyskutując zmiany zróżnicowania taksonomicznego bakterii Doktorantka pisze, że zwiększenie bioróżnorodności w ścieku oczyszczonym, w porównaniu do komory napowietrzania i ścieku surowego, może być wynikiem tworzenia się biofilmów. Tak może być, ale jakie jeszcze inne czynniki mogą przyczyniać się do zwiększenia genetycznego zróżnicowania bakterii w ściekach oczyszczonych?

Pracę kończą wnioski będące odzwierciedleniem w otrzymanych wynikach. Wnioski są poprawne i pokazują zdolność Doktorantki do syntetycznego ujęcia rezultatów pracy. Mam jednak uwagę do wniosku nr 6 - jest zbyt ogólny, zawsze bowiem rezystom uzależniony jest od składu bakterii. Proszę o uściślenie tego wniosku.



Doktorantka zebrała bardzo bogate piśmiennictwo. W mojej ocenie w spisie tym znajdują się wszystkie ważne publikacje dotyczące zakresu badań Doktorantki, które ukazały się w ciągu ostatnich kilku lat. Zebraną literaturę umiejętnie wykorzystała.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa pt.: „Geny integraz i oporności na antybiotyki β -laktamowe i glikopeptydowe rezystomu ścieków miejskich” wykonana przez Panią mgr Nicolettę Makowską stanowi oryginalną pracę naukową i w pełni spełnia warunki wymagane dla dysertacji doktorskich zawarte w Ustawie o Stopniach i Tytułach Naukowych z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami. Doktorantka udowodniła, że potrafi rozwiązywać problemy naukowe i posiada teoretyczną wiedzę w zakresie mikrobiologii i biotechnologii środowiska. Pokazała, że biegle posługuje się szerokim wachlarzem metod badawczych stosowanych w mikrobiologii i biologii molekularnej oraz ma umiejętność prezentowania, interpretacji i dyskusji wyników. W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr Nicoletty Makowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową dysertacji, szeroki zakres badań, staranne opracowanie rozprawy doktorskiej oraz ogrom pracy włożony w przeprowadzenie badań i analizę bioinformatyczną otrzymanych wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

20/07/2014