

Prof. dr hab. Andrzej K. Siwicki, profesor zwyczajny
Zakład Patologii i Immunologii Ryb
Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Paździor pt. „Charakterystyka i określenie czynników chorobotwórczości *Shewanella putrefaciens* u ryb” wykonanej w Zakładzie Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynarii – Państwowego Instytut Badawczego w Puławach pod kierunkiem naukowym dr hab. Dariusza Wasyla, prof. nadzw. oraz promotora pomocniczego dr hab. Agnieszki Pękali-Safińskiej, prof. nadzw.

Podstawa formalna recenzji.

Uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 25.11. 2015 roku.

Na podstawie udostępnionych dokumentów, przekazanych przez prof. dr hab. Dariusza Bednarka Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, przygotowano ocenę rozprawy doktorskiej zgodnie z kryteriami określonymi w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz.1852).

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej.

Recenzowana rozprawa doktorska ma formę manuskryptu i odpowiada standardom rozpraw doktorskich. Została przedstawiona na 51 stronach obejmujących: wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wykaz skrótów, wstęp, uzasadnienie podjęcia badań, cel i zakres prac doświadczalnych, materiał i metody, omówienie głównych wyników 3 prac stanowiących podstawę rozprawy, kierunki dalszych badań, wnioski i obserwacje, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, dokumentacja uzupełniająca (fotografie i ryciny) oraz fotokopie publikacji stanowiących rozprawę doktorską.

W skład jednotematycznego cyklu wchodzi trzy prace opublikowane w czasopiśmie indeksowanym (JCR):

1. Paździor E. : *Shewanella putrefaciens* – a new opportunistic pathogen of freshwater fish. Journal of Veterinary Research. 2016, 60: 429-434 (IF=0,462; punkty MNiSW: 15).
2. Paździor E., Pękala-Safińska A., Wasyl D.: Phenotypic diversity and potential virulence factors of the *Shewanella putrefaciens* group isolated from freshwater fish. Journal of Veterinary Research. 2019, 63: 321-332 (IF = 0,829; punkty MNiSW: 20).
3. Paździor E., Pękala-Safińska A., Wasyl D.: Genotypic diversity among *Shewanella* spp. collected from freshwater fish. Journal of Fish Diseases. 2019, 42: 677-684 (IF = 2,004; punkty MNiSW: 35).

Sumaryczny współczynnik wpływu IF = 3,295, a liczba punktów wg MNiSW wynosi 70. Przedstawione 3 prace mają charakter prac oryginalnych, prezentujących wyniki badań własnych. Jak wynika z załączonych do dokumentów, przesłanych przez Przewodniczącą Komisji Doktorskiej Rady Naukowej PIWet-PIB w Puławach, oświadczeniach współautorów udział Doktorantki w przedstawionych pracach jest znaczący i pierwszoplanowy ze 100 % udziałem w pierwszej pracy oraz 75 % udziałem w pozostałych dwóch pracach. Doktorantka jest osobą odpowiedzialną za całość publikacji z 10 % udziałem promotora oraz 15 % udziałem promotora pomocniczego w publikacjach nr 2 i 3. Wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na włączenie tych publikacji do zbioru składającego się na dysertację doktorską mgr inż. Ewy Paździor.

Problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego.

Choroby bakteryjne stanowią poważny problem w chowie i hodowli ryb słodkowodnych i mają znaczący wpływ na efekty ekonomiczne w akwakulturze. Równocześnie postępujące skażenie środowiska i obserwowane globalne zmiany klimatyczne powodują pojawienie się nowych jednostek chorobowych tła bakteryjnego w hodowli ryb na całym świecie. Przykładem może być bakteria *Shewanella putrefaciens* należąca do rodziny *Alteromonadaceae*. Drobnoustroje te, do niedawna uważane za halofilne, dzięki zdolnościom adaptacyjnym do zmieniających się warunków środowiskowych stały się przyczyną zaburzeń

zdrowotnych obserwowanych w hodowlach ryb słodkowodnych. W ostatnich latach obserwuje się znaczący wzrost zachorowań ryb na szewanellozy w akwakulturze, a straty spowodowane tą chorobą stale wzrastają, szczególnie w okresie wiosennym i sięgają nawet do 60% obsady. Bakteria ta zasiedla środowiska morskie, jednak w ostatnich latach coraz częściej izolowana jest ze środowiska słodkowodnego. *Shewanella putrefaciens* jest jednym z głównych mikroorganizmów odpowiedzialnych za procesy gnilne produktów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego. Wykazuje patogenność dla wielu gatunków ryb morskich i słodkowodnych, ale nasilające się straty powodowane tą bakterią obserwuje się szczególnie u pstrąga tęczowego, karpia, węgorza europejskiego i troci wędrownej. Objawy kliniczne i zmiany anatomopatologiczne szewanellozy nie są charakterystyczne, a choroba przyjmuje różną postać, od zmian skórnych do głębokich zmian wybroczynowych w narządach wewnętrznych. Zmianom towarzyszy pociemnienie powłok zewnętrznych, wytrzeszcz gałek ocznych i zmiany nekrotyczne w skrzelach. Równocześnie ze wzrostem śmiertelności wywołanej tą chorobą, stwierdzono występowanie antybiotykooporności tej bakterii w stosunku do wybranych grup preparatów, a ostatnie badania potwierdziły występowanie zjawiska wielolekooporności niektórych szczepów bakterii z rodzaju *Shewanella*, co jest zjawiskiem wysoce niepokojącym.

Problematyka naukowa podjęta przez Doktorantkę posiada znaczący aspekt poznawczy i praktyczny. W przedstawionej do recenzji pracy, podjęła się autorka nowego, mało poznanego zagadnienia jakim jest charakterystyka i określenie czynników chorobotwórczości *Shewanella putrefaciens* u ryb słodkowodnych. W uzasadnieniu podjęcia badań Doktorantka jasno i precyzyjnie określiła co jest istotą podjętych badań. Cele pracy są spójne ze zidentyfikowanymi do rozwiązania problemami naukowymi. Doktorantka podjęła się trudnego zadania, którego celem było określenie zależności pomiędzy fenotypową i genotypową charakterystyką izolatów *S. putrefaciens*, a ich chorobotwórczością dla wybranych gatunków ryb hodowlanych. Jednakże wg mojej opinii zakres prac doświadczalnych jest przedstawiony mało czytelnie.

Poprawność i oryginalność metodyczna, ocena wyników badań oraz ich omówienia.

Materiał i metody są dobrze dobrane oraz adekwatne do celu i zakresu badań. W latach 2007-2016 od ryb słodkowodnych wyizolowano w Zakładzie Chorób Ryb

PIWet-PIB w Puławach 160 izolatów *S. putrefaciens*, z czego 123 pochodziły od ryb hodowlanych: karp (81), pstrąg tęczowy (33), jesiotr (5), węgorz (94), 22 izolaty pochodziły od ryb wolnożyjących oraz 15 izolatów pochodziło od ryb akwariowych importowanych do Polski z Izraela i Kamerunu. Z tak bogatego materiału wyselekcjonowano grupę 51 izolatów, które objęto badaniami w ramach dysertacji doktorskiej. Reprezentowały one wszystkie w/w gatunki. Nasuwa się jednak pytanie „jakie kryteria zostały zastosowane do wyselekcjonowania tej grupy badawczej?”. Układ doświadczeń oraz schemat prowadzonych badań jest przedstawiony jasno i zwięźle, co pozwala na łatwą obserwację i pełną ocenę postępowania diagnostycznego. Metody badawcze użyte do rozwiązania zamierzonych celów są prawidłowo dobrane i spełniają wymogi stawiane nowoczesnym technikom badawczym stosowanym w diagnostyce mikrobiologicznej. Aby umożliwić kompleksową charakterystykę bakterii należących do gatunku *S. putrefaciens* Doktorantka wykonała molekularną identyfikację wybranych izolatów przy zastosowaniu między innymi metody Sengera, a uzyskane sekwencje oceniła w programie MEGA. Identyfikację do poziomu gatunku autorka dokonała na podstawie podobieństwa uzyskanych sekwencji do sekwencji referencyjnych znajdujących się w bazie GenBank. Są to standardowe metody powszechnie stosowane w diagnostyce molekularnej. Analizę filogenetyczną badanych izolatów oraz ocenę zróżnicowania genotypowego *Shewanella* przeprowadzono prawidłowo przy zastosowaniu nowoczesnych metod badawczych. Również badania genomów bakterii należących do gatunku *S. putrefaciens* wykonano prawidłowo przy użyciu zaadaptowanej dla potrzeb badań własnych metody opisanej w protokole „Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE ...”. Cennym elementem dysertacji są eksperymentalne badania określające chorobotwórczość badanej bakterii *S. putrefaciens* przez wykonanie zakażeń eksperymentalnych na dwóch gatunkach ryb hodowlanych. W tym przypadku wyselekcjonowano 8 izolatów do zakażeń eksperymentalnych, a ich wybór był w pełni uzasadniony, co zostało precyzyjnie przedstawione w pracy nr 2.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób zwięzły i jasny. Autorka w sposób przemyślany przeanalizowała uzyskane wyniki badań, które wg mojej opinii posiadają dużą wartość poznawczą i praktyczną, wnosząc nowe dane do bakteriologii klinicznej ryb. Poczynione obserwacje zamieszczone na końcu dysertacji są wartościowym elementem wprowadzającym czytającego do obiektywnej

oceny sformułowanych wniosków. Wnioski są skomponowane prawidłowo i nie budzą zastrzeżeń merytorycznych. Cennym elementem dysertacji jest umieszczona na końcu „Dokumentacja uzupełniająca” w skład której wchodzi bardzo dobrej jakości fotografie przedstawiające obraz kliniczny szewanellozy (Fot. 1-5) oraz uzyskane wyniki diagnostyki laboratoryjnej (Fot. 6-16). Uważam że powinny być zatytułowane „Fot.”, a nie „Ryc.”, co jest zgodne z przedstawioną dokumentacją.

Ocena znajomości literatury dotyczącej problematyki badań.

Cytowane piśmiennictwo zamyka się liczbą 66 pozycji literaturowych. Dobór bogatego, najnowszego piśmiennictwa wskazuje na dużą dojrzałość naukową doktorantki, która w bardzo umiejętny sposób wyselekcjonowała z bogatej literatury źródłowej najcenniejsze pozycje potwierdzające celowość podjętych badań.

Przydatność uzyskanych wyników w praktyce.

Przeprowadzone przez mgr inż. Ewę Paździor badania w ramach dysertacji doktorskiej są pionierskie pod względem zastosowanych metod badawczych oraz uzyskanych wyników oraz przyczyniły się do poszerzenia bardzo skromnej wiedzy o bakteriach z grupy *S. putrefaciens*, do której to grupy Doktorantka zaliczyła trzy gatunki patogenne dla ryb hodowlanych w Polsce. Uzyskane wyniki badań wnoszą nowe dane do etiologii i patogenezы szewanellozy u ryb hodowlanych i stanowią podstawę do doskonalenia metod diagnostyki, profilaktyki i terapii tej nowej jednostki chorobowej u karpia i pstrąga tęczowego. Szczególnie istotna będzie kontynuacja badań z ukierunkowaniem na immunoprofilaktykę swoistą opartą na autoszczepionkach.

Uwagi polemiczne i dyskusyjne.

Po pełnej analizie pracy nasuwa się jeszcze kilka drobnych uwag, dotyczących szczególnie niezręcznych sformułowań, czy braku w niektórych miejscach właściwej interpunkcji. Nie zostały one wymienione w recenzji, a jedynie zaznaczone w tekście rozprawy, gdyż według mojej opinii nie rzutują one na bardzo wysoka wartość merytoryczną rozprawy. Praca jest napisana bardzo przejrzyście, z prawidłowym użyciem nazewnictwa charakterystycznego dla danej dyscypliny naukowej. Nie stwierdzam nadmiernego używania zamienników anglojęzycznych, które tak powszechnie wnikają w treść wielu rozpraw na stopień naukowy.

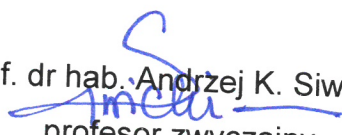
Doktorantka w pełni wywiązała się z bardzo trudnego zadania, a zamierzone cele badawcze oraz uzyskane wyniki przedstawiła w trzech bardzo cennych opracowaniach, które zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu światowym.

Wniosek końcowy.

Na podstawie przedstawionej oceny stwierdzam, że mgr inż. Ewa Paździor opanowała w pełni zasób wiedzy, pozwalających na realizację badań w zakresie wymaganym od pracownika ze stopniem naukowym doktora nauk weterynaryjnych, a oceniana praca doktorska posiada dużą wartość naukową i praktyczną.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Paździor w pełni odpowiada warunkom stawianym tego typu opracowaniom na stopień naukowy doktora oraz spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz.1852). W związku z pozytywną oceną dysertacji doktorskiej przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Ewy Paździor do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie powołując się na zapis w Regulaminie wyróżniania rozpraw doktorskich przez Dyrektora PIWet-PIB w Puławach (zakładka o Instytucie/Władze Instytutu/ Rada Naukowa/Komisje RN} wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą ze względu na dużą wartość poznawczą i praktyczną badań.

Olsztyn, dnia 31 października 2019 r.

Prof. dr hab. Andrzej K. Siwicki

profesor zwyczajny