

Dr hab. Marta Dec, prof. uczelni
Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 28.11.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Olgi Goławskiej
pt. „Charakterystyka wybranych bakterii jelitowych występujących u obcych
gatunków żółwi”,**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Wasyla i promotora pomocniczego dr
Magdaleny Zając w Zakładzie Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego –
Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Podstawę formalną recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu
Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 07 czerwca 2023 r.

Przedstawiona do oceny dysertacja dotyczy charakterystyki mikrobioty jelitowej obcych i inwazyjnych gatunków żółwi występujących na terenie Polski. Zwierzęta te mogą być źródłem drobnoustrojów chorobotwórczych i lekoopornych szczepów bakterii stanowiących zagrożenie dla rodzimych gatunków gadów i innych grup zwierząt, a także dla człowieka. W zbiorach literatury krajowej jak i światowej niewiele jest pozycji opisujących skład mikrobioty jelitowej żółwi; większość autorów skupia się na ocenie występowania i charakterystyce pojedynczych rodzajów lub gatunków bakterii (głównie *Salmonella* spp.) izolowanych od tych zwierząt. Uważam zatem, że podjęta przez mgr Olgę Goławską tematyka jest ważna z punktu widzenia rozwoju nauki jak i ochrony zdrowia publicznego. Pozytywnie oceniam zaproponowaną przez Doktorantkę koncepcję rozwiązania problemu naukowego.

Tytuł pracy jest zgodny z zawartymi w niej treściami, choć należy zauważyć, że badania Doktorantki nie ograniczały się jedynie do analizy próbek z jelit (analizowała też próbki pobrane z narządów wewnętrznych czy jaj żółwi).

Rozprawa doktorska mgr Olgi Goławskiej ma formę monografii zawierającej komplet rozdziałów typowych dla tego typu opracowań, tj. 1) Wstęp, 2) Uzasadnienie badań i cel pracy, 3) Materiał i metody, 4) Wyniki, 5) Dyskusja, 6) Wnioski, 7) i 8) Streszczenie w języku polski i angielskim, 9) Piśmiennictwo. Praca liczy 141 stron, opatrzona bogatą literaturą w liczbie 266 pozycji, zawiera 18 tabel i 12 rycin, które wzbogacają pracę i ułatwiają odbiór treści (choć niektóre tabele należałoby przeformatować w celu zwiększenia klarowności prezentowanych wyników). Szkoda jednak, że tabele i ryciny, szczególnie te zawierające wyniki badań, zostały

zamieszczone na końcu dysertacji (w Aneksie A i B), a nie bezpośrednio obok tekstu nawiązującego do zawartości danej tabeli czy ryciny. Układ zaproponowany przez Doktorantkę jest dość niewygodny dla czytelnika, który traci sporo czasu na odszukanie właściwej tabeli czy ryciny, gubiąc przy tym niejednokrotnie wątek. Praca jest przejrzysta, napisana poprawnym językiem polskim z zastosowaniem zasad gramatycznych oraz fachowego nazewnictwa. Potknięcia stylistyczne zdarzają się sporadycznie [np. „licznych i różnorodnych” – zwrot powtórzony w dwóch kolejnych zdaniach – str. 63; gen CMY-2 – nazwy genów należy pisać z małej litery i kursywą – str. 54; „E. coli [...] wykazują zwykle mniej genów” (zamiast zawierają) – str. 9; „obserwowana przez innych badaczy, jak *Chryseobacterium* spp.” – str. 42; „ogromne zróżnicowanie klonów tych gatunków” (klony są identyczne) – str. 58; na str. 30 i 31 Doktorantka niepotrzebnie powtarza w dwóch kolejnych zdaniach informacje o klasach środków przeciwdrobnoustrojowych, na które oporność wykazywały szczepy *E. coli* od żółwi z grupy 1; pierwsze zdanie rozdz. 4.3.2.2 sugeruje, że tylko 62 żółwie analizowano pod kątem występowania bakterii *Aeromonas veroni* – str. 34, ta sama uwaga tyczy się pierwszego zdania rozdz. 4.3.2.1 i 4.3.2.3.; „dokładniejsze analizy poświęcono” (raczej przeprowadzono lub dokładniejszym analizom poddano) – str. 60].

We Wstępie liczącym 11 stron Autorka w klarowny sposób zapoznaje czytelnika z tematem pracy omawiając zagadnienie występowania obcych i inwazyjnych gatunków żółwi na terenie Polski oraz handlu tymi zwierzętami. Szerzej przedstawiła informacje nt. mikroorganizmów zasiedlających jelita żółwi, zarówno bakterii (ze szczególnym uwzględnieniem pałeczek *Salmonella* i *E. coli*), jak i grzybów, pasożytów oraz wirusów (informacje dotyczące innych niż bakterie mikroorganizmów można było nieco ograniczyć, ponieważ Doktorantka nie uwzględniała ich w swoich badaniach). Ostatni podrozdział poświęciła zagrożeniom zdrowotnym jakie mogą stwarzać mikroorganizmy występujące u żółwi. Wiedzą ogólną z zakresu tematu pracy Doktorantka wykazała się zresztą już wcześniej w pracy przeglądowej pt. „Mikroflora i parazytofauna obcych i inwazyjnych gatunków żółwi” (Goławska O. i wsp., *Postępy Mikrobiologii* 2017, 2(56): 163-170), w której jest pierwszym autorem.

Cele pracy zostały określone w 6-ciu punktach. Nie są one jednak w pełni kompatybilne z założeniem pracy, którym była „kompleksowa ocena składu flory bakteryjnej” u żółwi. Zastosowane przez Doktorantkę metody badawcze (standardowe metody posiewowe i hodowla bakterii) nie pozwalają na kompleksową ocenę składu mikrobioty jelitowej, gdyż jak powszechnie wiadomo tylko pewien odsetek bakterii zasiedlających przewód pokarmowy ludzi i zwierząt daje się hodować w warunkach laboratoryjnych. Ponadto Doktorantka analizowała jedynie obecność bakterii zdolnych do wzrostu w warunkach tlenowych (choć w rozdz. 3, str. 20-22 brak informacji o atmosferze w jakiej prowadzono hodowle) natomiast grupa bakterii bezwzględnie beztlenowych została pominięta w badaniach. Ciekawi mnie dlaczego Doktorantka zdecydowała się na metodę posiewów i hodowli bakterii *in vitro* podczas gdy aktualnie dostępne są metody biologii molekularnej (sekwencjonowanie NGS genów 16S rRNA, 18S rRNA i/lub regionów ITS) umożliwiające kompleksową ocenę składu mikrobiologicznego danej próbki, w tym próbki pobranej z jelit.

Za cel nr 1 Doktorantka postawiła sobie „dostarczenie dowodów potwierdzających występowanie bakterii chorobotwórczych u obcych i inwazyjnych gatunków żółwi”; tak postawiony cel badań zawiera odgórne założenie, iż badane żółwie będą źródłem bakterii chorobotwórczych. W ocenie Recenzenta cel ten należałoby przeformułować do „Ocena występowania u obcych u inwazyjnych gatunków żółwi bakterii chorobotwórczych dla zwierząt i ludzi”.

Doprecyzowania wymaga także wniosek nr 4, gdyż nie wiadomo o jaką charakterystykę pałeczek *Salmonella* i *E. coli* chodzi (fenotypową? genotypową?), a „analiza oporności” też jest elementem charakterystyki izolatów bakterii. Co więcej cel zawiera odgórne założenie, że wyizolowane szczepy *Salmonella* i *E. coli* będą się odznaczały lekoopornością (właściwsze byłoby tu sformułowanie „określenie lekooporności”).

Cel nr 5 należało by uściślić gdyż pod pojęciem „różnorodność mikrobiologiczna flory jelitowej” należy rozumieć nie tylko różnorodność rodzajów/gatunków bakterii (tlenowych, beztlenowych), ale także innych mikrobów (grzyby, protisty), których obecności w pobranych próbkach Doktorantka nie analizowała.

Cel nr 6 zawiera niejasne określenie „nowe klony bakterii”; termin ten przewija się wielokrotnie w treści pracy i dopiero w rozdz. Dyskusja czytelnik dowiaduje się, że pod pojęciem klonu kryją się szczepy reprezentujące określone typy sekwencyjne (str. 42). Zgodnie z definicją podaną w słowniku języka polskiego PWN (<https://sjp.pwn.pl/>) klon to komórka lub organizm otrzymane sztucznie, drogą bezpłciowego podziału komórki lub organizmu rodzicielskiego, identyczne genetycznie jak komórka lub organizm wyjściowy. Natomiast szczepy reprezentujące ten sam typ sekwencyjny nie koniecznie są klonami, bo np. jedne mogą zawierać pewne geny (np. geny oporności), a nawet całe plazmidy, a inne szczepy o tym samym ST tych genów nie zawierają (np. Gondal i wsp. *Microorganisms* 2022,10(11):2283; Mshana i wsp. *BMC Infectious Diseases* 2016, 16(1)). Stąd, w opinii Recenzenta określenie „klony” winno być zastąpione terminem „szczepy” bądź „szczepy reprezentujące nowe/określone typy sekwencyjne”.

Badania zostały przeprowadzone na bardzo dużej liczbie zwierząt i pobranych od nich próbek. Łącznie były to aż 142 żółwie reprezentujące 12 gatunków. 16 osobników pochodziło z importu, a 126 żółwi zostało odłowionych ze środowiska naturalnego - z 27 (jak wynika z Ryc. A3.) zbiorników wodnych zlokalizowanych gł. w woj. lubelskim.

Praca doktorska została zrealizowana w ramach projektu pt. „Inwazyjne gatunki żółwi jako źródło i wektor patogenów zwierząt i ludzi” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2013/11/B/NZ7/01690); kierownikiem projektu był Promotor – prof. dr hab. Dariusz Wasyl. Zakładam, że Autorzy grantu uzyskali stosowne zgody na odłowy i wykonywanie badań naukowych na zwierzętach, jednak Doktorantka nie przedstawiła klarownie tek kwestii w dysertacji. Gatunki żółwi (ozdobny, jaszczurowaty, ostrogrzbiety, malowany) uwzględnione w pracy doktorskiej znajdują się na liście inwazyjnych gatunków obcych (IGO) stwarzających zagrożenie dla Unii i liście inwazyjnych gatunków obcych stwarzających zagrożenie dla Polski (Poz. 2649 Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 9 grudnia 2022 r.) i podlegających tzw. szybkiej eliminacji. Wedle Ustawy z dnia 11 sierpnia 2021 r. o gatunkach obcych (Dz. U. 2021

poz. 1718) wszelkie działania zaradcze w stosunku do IGO nadzoruje właściwy regionalny dyrektor ochrony środowiska (lub dyrektor parku narodowego – na obszarze tego parku), który może wydać zezwolenie na przetrzymywanie IGO w celu prowadzenia badań naukowych. Z treści dysertacji dowiadujemy się, że wedle opinii II Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach uzyskanie zgody tejże Komisji na prowadzenie odłowów nie było konieczne. Nie wiadomo jednak jakie było stanowisko Lokalnej Komisji Etycznej ws. eutanazji żółwi. Zwierzęta wykorzystywane w badaniach naukowych podlegają zapisom Ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, której Art. 8 mówi, że nie wykonuje się procedur na zwierzętach dziko żyjących. Stąd, w celu rozwiania wszelkich wątpliwości natury prawnej wskazanym byłoby zamieszczenie w dysertacji zgody (tudzież opinii) Lokalnej Komisji Etycznej na wykorzystanie odłowionych żółwi do badań naukowych.

Z etycznego punktu widzenia nasuwa się pytanie czy istniała konieczność uśmiercania tak dużej liczby żółwi (n=104), czy nie można było chociaż w przypadku części zwierząt oprzeć się na analizie próbek kału. Zastanawia mnie także, czy w zastawione pułapki wpadały tylko żółwie gatunków obcych i inwazyjnych czy może także osobniki będącego pod ścisłą ochroną żółwia błotnego (*Emys orbicularis*) (Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 16 grudnia 2016 r. w sprawie ochrony gatunkowej zwierząt).

Od żółwi Doktorantka pobrała ogromną liczbę próbek do posiewów mikrobiologicznych - łącznie 483, w tym 28 od żółwi padłych w transporcie oraz 455 próbki od osobników odłowionych. Były to zarówno próbki przyżyciowe pobrane z pojemników transportowych jak i próbki z jelit oraz narządów wewnętrznych pobrane pośmiertnie.

Zakładam, że mgr Olga Goławska wykonywała nie tylko analizy laboratoryjne, ale także uczestniczyła w pracach terenowych związanych z odłowami żółwi. Etap ten wymagał specjalnych przygotowań i musiał być rozciągnięty w czasie. Działania w terenie z pewnością nie należały do łatwych, czystych i przyjemnych, a były punktem wyjścia w realizacji znacznej części tej pracy doktorskiej i zasługują na uznanie.

Odłowione żółwie poddawano kwarantannie trwające od 2 do nawet 14 tygodni. Doktorantka nie uzasadniła jednak jej celowości, ani nie wyjaśniła czym był podyktowany zróżnicowany okres jej trwania. Jak można się domyślać przetrzymywane żółwie obserwowano pod kątem występowania ewentualnych objawów chorobowych. W doktoracie nie przedstawiono jednak wyników tych obserwacji jak również informacji o przyczynie śmierci żółwi importowanych. Dane o statusie zdrowotnym zwierząt są kluczowe w kontekście prowadzonych analiz mikrobiologicznych. Liczę, że w trakcie obrony Doktorantka udzieli odpowiedzi na pytanie czy w grupie badanych zwierząt były osobniki wykazujące symptomy chorobowe, a jeśli tak to czy stwierdzono u nich obecność swoistych gatunków bakterii? Ciekawi mnie także czy było zróżnicowanie w składzie mikrobioty (zestaw gatunków bakterii) pomiędzy żółwiami importowanymi i odłowionymi ze środowiska naturalnego.

Drugi ważny aspekt, na który należy zwrócić uwagę w przypadku badań na grupie żółwi odłowionych to wpływ okresu kwarantanny na skład mikrobioty jelitowej. Oczywistym jest, że w trakcie izolacji (trwającej nawet ponad 3 m-ce) żółwie były karmione i w pewnym stopniu narażone na kontakt z opiekunem, a to mogło spowodować zmianę natywnego składu ich

mikrobioty jelitowej (a w efekcie prowadzić do uzyskania „zafaszowanych” wyników badań). Ponadto część izolatów bakteryjnych pozyskanych z próbek przyżyciowych (z pojemników transportowych) mogła pochodzić ze środowiska (wody), w którym żółwie żyły, a nie koniecznie były to szczepy kolonizujące jelito tych zwierząt. W dysertacji zabrakło omówienia wyników obrazującego które z pozyskanych gatunków bakterii występowały jedynie w próbkach przyżyciowych (o ile takie były).

Wyniki badań dotyczących charakterystyki bakterii wyizolowanych od 16 żółwi importowanych zostały już opublikowane w 2019 r. w pracy autorstwa: Goławska O., Zając M., Maluta A., Pristas P., Hamarová L., Wasyl D. pt. „Complex bacterial flora of imported pet tortoises deceased during quarantine: Another zoonotic threat?”, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2019, 65:154-159. Stąd, zdaniem Recenzenta tę część badań winna być wyłączona z dysertacji, zwłaszcza, że praca doktorska jest dziełem jednego autora, natomiast opublikowana praca jest wieloautorska i pomimo, że Doktorantka jest pierwszym autorem to nie wiadomo jaki jest Jej udział w tej pracy. Ponadto, powielenie w monografii opublikowanych już wyników umniejsza jej oryginalności. W moim odczuciu badania dotyczące jedynie żółwi odłowionych ze środowiska, z uwagi na bardzo dużą liczbę zwierząt (n=126) i próbek biologicznych (n>480), byłyby w zupełności wystarczające jeśli chodzi o zakres pracy doktorskiej. Natomiast w zaistniałej sytuacji włączenia opublikowanych wyników badań do doktoratu należało w dysertacji zamieścić pełną wersję publikacji oraz deklaracje poszczególnych współautorów o udziale w jej powstawaniu.

Badania przeprowadzone przez mgr Olę Goławską w ogólnym zarysie polegały na analizie bakteriologicznej pobranych od żółwi próbek. Pozyskane izolaty zostały zidentyfikowane za pomocą kilku metod. Charakterystyka fenotypowa obejmowała szczepy *Salmonella* (n=78) i *E. coli* (n=64) i polegała na określeniu ich lekowrażliwości, a w przypadku pałeczek *Salmonella* także na określeniu serotypu. Charakterystyce genotypowej poddano część izolatów wybranych gatunków bakterii, a w jej zakres wchodziła detekcja genów oporności i mutacji determinujących oporność na chinolony, detekcja genów wirulencji, plazmidów oraz określenie typu sekwencyjnego pozyskanych izolatów.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem szeregu metod laboratoryjnych, poczynając od standardowych i prostych aczkolwiek pracochłonnych, zwłaszcza przy tak dużej liczbie przebadanych próbek, metod mikrobiologicznych tj. izolacja i hodowla bakterii na kilku różnych pożywkach, analizy biochemiczne i serotypowanie w oparciu o aglutynację (dla szczepów *Salmonella*), po nowoczesne metody biologii molekularnej takie jak spektrometria mas typu MALDI-TOF, sekwencjonowanie Sangera, sekwencjonowanie genomowe i PCR. Doktorantka wykazała się także umiejętnością posługiwania się różnymi narzędziami bioinformatycznymi służącymi do analizy sekwencji DNA, w tym sekwencji genomowych, a także sprawnością poruszania się po systemach do deponowania sekwencji DNA w bazach danych (GenBank, European Nucleotide Archive, PubMLST, Enterobase). Wyniki badań zostały poddane odpowiedniej analizie statystycznej. Mając powyższe na uwadze, uważam, że warsztat badawczy jakim legitymuje się mgr Olga Goławska jest bardzo szeroki. Mam natomiast pewne uwagi i zapytania co do opisu niektórych metod badawczych.

- Jakie objawy kliniczne i/lub wyniki badań laboratoryjnych były przesłanką do powtórnego pobrania próbek przyżyciowych od żółwi? (str. 20).
- W rozdz. 3.1.1 dotyczącym metodyki oznaczania lekowrażliwości bakterii zabrakło bardzo ważnej informacji nt. wytycznych jakimi kierowała się Autorka dokonując kategoryzacji szczepów na wrażliwe i odporne na poszczególne substancję przeciwdrobnoustrojową (trudno żeby czytelnik analizował ustawienia oprogramowania do odczytu mikroplątek).
- Opis metodyki dotyczącej analiz genomowych jest fragmentami niejasny, np. „Programy freebayes [123] odpowiadał za wywołanie wariantów...” – o jakie warianty chodzi?; podobnie mało klarownie opisana jest metodyka dotycząca analiz filogenetycznych - w oparciu o co określano pokrewieństwo między szczepami? Czy były to analizy genomu rdzeniowego?
- W dysertacji nie podano kryteriów identyfikacji bakterii przy użyciu spektrometrii mas typu MALDI-TOF (str.22), składu pożywki BxLH (opracowanie własne PIWet-PIB, str. 20) i nie wyjaśniono celu suplementacji pożywki MacConkey cefotaksymem (str. 21).
- W rozdz. 3.3.2 (Materiały i metody) Autorka nie podała jakie geny oporności wykrywała u izolatów *E. coli* ani odniesienia do sekwencji użytych starterów i warunków PCR, choć tabela zawierająca te dane została zamieszczona na str. 136.
- Geny i sekwencje starterów zamieszczone w Tabeli B.1 (str. 136) powinny być pogrupowane i oznaczone, tak by czytelnik miał jasność, które odnoszą się do genów oporności, a które były wykorzystywane np. do identyfikacji *E. coli/Salmonella* itd. Wskazaniem byłoby także zamieszczenie informacji na jakie substancje przeciwdrobnoustrojowe wymienione geny warunkują oporność oraz uwzględnienie podziału na pojedyncze reakcje PCR oraz multipleks PCR. Pomiędzy Tabelą B.1 i B2. brak jest pełnej spójności – Tabela B.2 zawiera warunki amplifikacji tylko części genów wymienionych w Tab. B.1. Ciekawi mnie czy Doktoranta samodzielnie wyznaczała średnią temp. topnienia (T_m) poszczególnych par starterów (Tab. B.1) i dlaczego podana w Tab. B.2 temp. przyłączania starterów w niektórych przypadkach jest wyższa od T_m , a w niektórych równa T_m (geny *mcr-1-5*) bądź niższa (gen *16S rRNA* $T_m=55^\circ\text{C}$, a temp. przyłączania tylko 42°C !).
- W Tab. B.3 brak jest odniesienia do genu *gyrA*, w którym Autorka wykazała obecność mutacji warunkujących oporność na chinolony u *E. coli* (str. 31).
- Czy Doktorantka analizowała jakość (stężenie, czystość, ewentualny stopień degradacji) wyizolowanego DNA genomowego przed użyciem w reakcjach PCR? (str. 21 i 22, jakość DNA wpływa na wynik reakcji PCR).
- Cefalosporyny należą do B-laktamów (drugie zdanie str. 31).
- Brak objaśnienia skrótu ONPG (str. 21).

Słabą stroną pracy doktorskiej mgr Olgi Goławskiej jest brak jednolitości prowadzonych badań, zarówno względem pobierania próbek biologicznych jak i pewnych analiz, które zostały przeprowadzone wybiórczo. Taki sposób realizacji badań wprowadza pewien chaos w dysertacji.

- Przy pobieraniu próbek z jelit z niewiadomych względów pominięto jednego osobnika z transportu (str. 19); próbki z wątroby, nerek, płuc pobierano tylko od żółwi z transportu i tylko od niektórych osobników. Natomiast próbki z woreczka żółciowego, oraz próbki kału pobierano tylko od żółwi odłowionych i również tylko od części osobników. Próbki z jajników pobrano od żółwi z obu grup, ale nie wiadomo czy od wszystkich samic.
- U różnych szczepów, nawet tego samego gatunku, Doktorantka stosowała odmienne metody badawcze, np. detekcję genów oporności u niektórych izolatów *E. coli* (od żółwi z importu) wykonywała za pomocą PCR, u innych (od żółwi z odłowu) – w oparciu o analizę sekwencji genomowych.
- U wielolekoopornych izolatów *E. coli* od żółwi z importu zidentyfikowano geny determinujące oporność na cefalosporyny, polimiksyny i chinolony, a z niewyjaśnionych względów pominięto detekcję genów warunkujących oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe z innych grup (tetracykliny, sulfonamidy, aminoglikozydy, fenikole, inhibitory kwasu foliowego, str. 31).
- Sekwencjonowanie genomowe przeprowadzono tylko dla części izolatów i były to wyłącznie szczepy od żółwi odłowionych. Ograniczenie stosowania tej metody ze względu na jej wysokie koszty jest zrozumiałe, jednak analiza sekwencji genomowych izolatów od żółwi z importu mogłaby wnieść nowe informacje, np. wyjaśnić molekularne tło oporności na kolistynę u *E. coli*.
- Geny wirulencji oznaczono jedynie dla 21 szczepów *E. coli* poddanych sekwencjonowaniu genomowemu. U pozostałych 43 izolatów Doktorantka nie oznaczyła genotypowych profili wirulencji choćby za pomocą PCR. W ocenie Recenzenta detekcja genów wirulencji była szczególnie wskazana u izolatów *E. coli* od żółwi z importu ze względu na powszechnie występującą u nich lekooporność. Szczepy lekooporne i jednocześnie zawierające geny wirulencji są bowiem szczególnie niebezpieczne. Podobna uwaga tyczy się oznaczania genów wirulencji u pałeczek *Salmonella*; detekcję wysp patogenności przeprowadzono w stosunku do 43 z 78 pozyskanych izolatów (wyłącznie od żółwi z odłowu). W kontekście postawionego celu badań jakim była ocena potencjału patogennego szczepów *Salmonella* i *E. coli* wskazana byłaby detekcja determinant wirulencji u wszystkich izolatów pozyskanych w trakcie badań.
- Rozdz. 4.3. zawiera informacje nt. występowania u żółwi odłowionych bakterii innych niż *Salmonella* i *E. coli* (str. 32). Niezrozumiałym jest jednak dlaczego w tych analizach pominięto żółwie padłe pochodzące z transportu (str. 32), zwłaszcza, że w publikacji „włączonej” do dysertacji potwierdzono izolację różnorodnych gatunków bakterii.

W toku realizacji pracy doktorskiej mgr Olga Goławska pozyskała ogromną liczbę 1589 izolatów bakteryjnych. Szkoda, że łącznie z informacją o liczbie zebranych izolatów (str. 26) nie podała do jakich grup taksonomicznych i w jakiej liczbie one przynależały, tak by już na początku rozdz. 4 (Wyniki) czytelnik miał ogólny pogląd na tę kwestię. W pracy nie przedstawiono także wyników identyfikacji bakterii przeprowadzonej przy użyciu poszczególnych metod, m.in. sekwencjonowania genów 16S rRNA (ile i które izolaty zidentyfikowano w oparciu o analizę

sekwencji 16S rDNA? czy uzyskane sekwencje zostały zdeponowane w GenBanku?) (suplement zawierający dokumentację z odczytu testów biochemicznych czy elektoroforegramów również byłby mile widziany).

Zastanawiające jest także czy w związku z deklarowanym przesiewaniem do 5 kolonii charakterystycznych dla *Salmonella*, zarówno z pożywki MSR/V jak i RSA, Doktorantka dokonywała eliminacji (redukcji liczby) izolatów w przypadku uzyskania wzrostu *Salmonella* z danej próbki na obu pożywkach jednocześnie. *Salmonellę* wykryto w 70 próbkach, co przy założeniu, że dla 80% z nich (n=56) wzrost *Salmonella* uzyskano zarówno na pożywce MSR/V jak i RSA (str. 38) daje liczbę 112 posiewów pozytywnych dla *Salmonella*, a zakładając dalej, że z każdej pożywki przesiewano tylko po 2 (a nie 5) kolonie charakterystyczne dla *Salmonella* to w efekcie Doktorantka musiała pozyskać przynajmniej 224 izolaty. Natomiast deklarowana liczba zebranych izolatów *Salmonella* to 78.

Wyniki dotyczące fenotypowej i genotypowej oporności 43 izolatów *Salmonella* pozyskanych od żółwi odłowionych oraz występowania u nich wysp patogenności i plazmidów zostały czytelnie przedstawione w kilkunastu tabelach (Tab. A.14). Podobnego zestawienia zabrakło w przypadku izolatów *E. coli*, zarówno tych pochodzących od żółwi importowanych jak i odłowionych. W moim odczuciu tabele A17, 18 i 19 powinny być zintegrowane, a wyniki przedstawione w taki sposób by uwidaczniały profile lekooporności oraz genotypowe profile oporności i wirulencji poszczególnych izolatów. Zbiorcza tabela dodałaby klarowności zawartemu na str. 31 opisowi wyników, w którym Autorka podaje, że wśród izolatów *E. coli* pozyskanych od żółwi odłowionych tylko 3 odznaczały się opornością fenotypową. Nie wiadomo jednak na które substancje przeciwdrobnoustrojowe te szczepy były odporne; następnie wymienia geny oporności wykryte u tych izolatów, ale nie informuje czy ich występowanie było skorelowane z opornością fenotypową. W kontekście stawianego celu pracy jakim była ocena potencjału chorobotwórczego tych bakterii wskazane byłoby także rozwinięcie zapoczątkowanego str. 49 (Dyskusja) wątku dotyczącego przyporządkowania badanych szczepów *E. coli* do określonych patotypów.

Niewątpliwym atutem ocenianej rozprawy doktorskiej, poza dużą liczbą przebadanych zwierząt (n=142) i próbek, są analizy genomowe, którym poddano łącznie 109 izolatów, w tym 43/78 izolaty *Salmonella*, 21/64 izolatów *E. coli*, 16/138 izolatów *Pseudomonas putina*, 16/107 izolatów *Aeromonas veroni*, 10 izolatów *Aeromonas hydrophila*. Doktorantka doskonale wykorzystwała potencjał pracowni sekwencjonowania genomowego (w technologii NGS) jaką dysponuje Zakład Analiz Omicznych PIWet-PIB. Analiza sekwencji genomowych pozwoliła na uzyskanie wielu cennych informacji o badanych szczepach oraz na określenie pokrewieństwa filogenetycznego między wybranymi grupami bakterii. W dysertacji nie zamieszczono jednak numerów dostępu analizowanych sekwencji genomowych, pomimo iż na str. 25 Autorka deklaruje ich zdeponowanie w bazach danych. U odłowionych żółwi Doktorantka wykazała występowanie szeregu szczepów reprezentujących nieopisane dotychczas typy sekwencyjne, w tym 1 szczep *Salmonella* (ST 6075, u którego zidentyfikowano nowy allel *dnaN*) oraz 37 szczepów rodzaju *Pseudomonas* i *Aeromonas*. W rozdz. Dyskusja pojawia się także informacja o zidentyfikowaniu u jednego szczepu *E. coli* nieznanego allelu (nie wiadomo o jaki gen chodzi), co mogło być podstawą do określenia nowego typu sekwencyjnego w 7-genowym schemacie

MLST. Doktorantka zdecydowała się jednak na zastosowanie w tym przypadku innego (8-genowego) schematu MLST. Szkoda także, że dla badanych izolatów *Pseudomonas* i *Aeromonas* nie zestawiono w tabelach typu sekwencyjnego z genotypowymi profilami lekooporności oraz ewentualnie występującymi u tych szczepów plazmidami (choć w rozdz. Wyniki brak odniesienia do identyfikacji plazmidów u izolatów *Pseudomonas putida* i *Aeromonas hydrophila* i nie wiadomo czy takie analizy zostały w ogóle przeprowadzone). Wartością dodaną dysertacji byłyby też informacje nt. wielkości analizowanych genomów czy zawartości w nich G+C.

Doktorantka wykazała dużą różnorodność rodzajów i gatunków bakterii występujących u żółwi. Do analizy wyników z tego zakresu podeszła zbiorczo, stąd ostatecznie nie wiadomo, które rodzaje/gatunki bakterii współwystępowały u poszczególnych osobników (choćby *Salmonella enterica* i *E. coli*). Tabela przedstawiająca zestawione gatunki bakterii przy jednoczesnym pogrupowanie osobników względem miejsca odłowu rzucałoby światło na ewentualny wpływ danego środowiska na skład mikrobioty jelitowej bądź eliminacyjne działanie jednych grup bakterii na inne. Warta podkreślenia jest wykazana przez Doktorantkę obecność pałeczek *Salmonella*, *Pseudomonas* i *Aeromonas* nie tylko w jelitach żółwi, ale także w jajnikach i jajowodach. Praca jest także pierwszym doniesieniem potwierdzającym obecność *Salmonella* w woreczku żółciowym u tych zwierząt.

Na podstawie analizy uzyskanych wyników badań Doktorantka wysunęła 4 zwięzłe i kompatybilne z sześcioma postawionymi celami pracy wnioski.

Wniosek nr 1 wymaga korekty stylistycznej - 2x powtarza się określenie „źródło i wektor” (w pierwszym zdaniu odnosi się ono do żółwi, w drugim do bakterii); szczepy bakteryjne mogą być wektorem (a tu lepiej źródłem bądź rezerwuarem) genów oporności, a nie „oporności” i to geny oporności mogą być kodowane na mobilnych elementach genomu, a nie „oporność”. Wydaje się też, że Doktorantka pomyliła transfer wertykalny (pionowy, tj. na komórki potomne) z transferem horyzontalnym (poziomy, tj. zachodzący między różnymi szczepami tego samego gatunku i między różnymi gatunkami, a nawet rodzajami bakterii). Odnośnie Wniosku nr 1 mam jeszcze zapytanie czy Doktorantka analizowała sekwencje plazmidów pod kątem występowania na nich genów oporności? Samo wykazanie jednoczesnego występowania genów oporności i plazmidu nie uprawnia do stwierdzenia, że zidentyfikowane geny oporności są zlokalizowane na plazmidzie (str. 63, 53).

Z kolei wniosek nr 4, w którym Autorka stwierdza, że „żółwie gatunków obcych mogą stanowić wektor przenoszący (styl - wektor to coś co przenosi) nowe rodzaje, gatunki i klonów bakterii dla środowiska Polski” winien być poparty zamieszczoną w dysertacji analizą, z której jasno by wynikało, które z wykrytych u żółwi rodzajów czy gatunków bakterii są nowe dla środowiska Polski. W rozdz. Dyskusja Autorka wskazuje na gatunek *Elizabethkinga meningoseptica* jako drobnoustrój niespotykany wcześniej na terytorium Polski (str. 58). Jednakże obecność tej bakterii (*Chryseobacterium meningosepticum*) została potwierdzona już w 2004 r. w wodzie Jeziora Maltańskiego (Hadas i wsp. *Acanthamoeba* spp. as vehicles of pathogenic bacteria, *Acta Parasitologica* 2004, 49:276-280). Z kolei *Lysinibacillus sphaericus* (str. 58) został wcześniej opisany jako drobnoustrój kolonizujący w Polsce roślinę o nazwie kruszczyk

szerokolistny (*Epipactis helleborine*) (Jakubska-Busse i wsp. 2021. Proteomics-based identification of orchid-associated bacteria colonizing the *Epipactis albensis*, *E. helleborine* and *E. purpurata* (Orchidaceae, Neottieae). *Saudi. J. Biol. Sci.* 2021, 28(7):4029-4038).

Podsumowując, pomimo pewnych uwag, uważam, że rozprawa doktorska mgr Olgi Goławskiej jest wartościowym opracowaniem stanowiącym wkład w rozwój nauk weterynaryjnych z zakresu mikrobiologii i herpetologii. Praca poszerza wiedzę nt. składu mikrobioty jelitowej obcych i inwazyjnych gatunków żółwi, charakterystyki fenotypowej i genotypowej wybranych grup taksonomicznych bakterii kolonizujących te zwierzęta, jak również wskazuje na zagrożenia zdrowotne związane z występowaniem u żółwi bakterii chorobotwórczych. Treść dysertacji ujawnia dużą wiedzę Autorki z zakresu tematu pracy oraz umiejętność prowadzenia badań zmierzających do rozwiązania postawionego problemu naukowego. W rozległej Dyskusji Doktorantka dowiodła także umiejętności prowadzenia polemiki naukowej (choć treści zawarte na pierwszej stronie rozdz. 5 dotyczące występowania u żółwi prątków, chlamydii i pewnych wirusów nie współgrają z uzyskanymi przez Doktorantkę wynikami badań). Dane przedstawione w dysertacji uzupełniają informacje nt. rozprzestrzeniania się lekoopornych szczepów bakterii na terenie naszego kraju. Monitorowanie obecności takich drobnoustrojów połączone z wyjaśnianiem mechanizmów oporności wpisuje się w „Europejski plan działania „Jedno zdrowie” na rzecz zwalczania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe” (wprowadzony w UE w 2017 r., COM/2017/0339). Dysertacja dostarcza także cennych informacji nt. występowania w Polsce obcych i inwazyjnych gatunków żółwi.

W świetle powyższej opinii stwierdzam, że praca doktorska mgr Olgi Goławskiej spełnia wymogi art. 13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. nr 65 poz. 595, tekst jednolity Dz. U. z 2017, poz. 1789). Przedkładam zatem Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

Lublin, 28.11.2023 r.



dr hab. Marta Dec