Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
W POZNANIU
KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

Poznań, 28.04.2023

Prof. UPP dr hab. inż. Anna Sip
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Gabrieli Cieniuch
pt. „Charakterystyka wybranych czynników wirulencji odzwierzęcych pałeczek *Serratia*"
wykonanej w na Wydziale Nauk Biologicznych
w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem prof. dr hab. Gabrieli Bugli-Płoskońskiej
oraz promotora pomocniczego dr inż. Agnieszki Korzeniowskiej-Kowal

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego Nr 37/2023, w związku z postępowaniem wszczętym celem nadania pani mgr Gabrieli Cieniuch stopnia naukowego doktora nauk biologicznych. Recenzja uwzględnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018, poz. 1668 z późn. zmianami).

Dobór i znaczenie tematu

Mikrobiom zwierząt jest bardzo złożony i nadal nie w pełni poznany. Tworzy go wiele wzajemnie powiązanych grup drobnoustrojów, zarówno komensalnych, patogennych, jak i oportunistycznie patogennych. Przykładem wciąż mało znanych składników mikrobiomu zwierząt są bakterie *Serratia*. Bakterie te do niedawana uważano za całkowicie bezpieczne. Obecnie wiadomo, że mogą wywoływać szereg schorzeń, zagrażających zdrowiu nie tylko zwierząt, ale i ludzi. W ostatnich latach coraz częściej raportowane są takie przypadki. Leczenie infekcji wywołanych przez *Serratia* jest trudne m.in. z uwagi na ich oporność na działanie wielu antybiotyków. Dodatkowy niepokój budzi zdolność *Serratia* do kolonizacji powierzchni abiotycznych oraz narastanie u nich oporności na działanie dezynfektantów. Wszystko to sprzyja rozprzestrzenianiu się tych bakterii w środowisku i potęguje ryzyko ich przedostania się do organizmu człowieka. Dlatego też niezbędne staje się monitorowanie zagrożeń związanych z *Serratia* oraz inicjowanie działań mających na celu ograniczanie ich niekontrolowanego rozprzestrzeniania się. Pierwszym krokiem ku temu jest identyfikacja źródeł oraz dróg transmisji tych bakterii. Równie ważna jest ocena ich potencjału chorobotwórczego, a co za tym idzie ryzyka wywołania przez nie infekcji. Ze względu na to, że naturalnym rezerwuarem *Serratia* są zwierzęta, zagrożenia związane z nimi powinny być zdefiniowane w pierwszej kolejności. W taką właśnie problematykę, i to w bardzo udany w

sposób, wpisuje się rozprawa doktorska pani mgr Gabrieli Cieniuch. Oceniana rozprawa stanowi przy tym doskonałe uzupełnienie obecnego stanu wiedzy na temat występowania oraz potencjalnej wirulencji *Serratia*. Co więcej, z uwagi kierunek podjętych badań oraz nade wszystko ich efekt (utworzenie unikalnej kolekcji), ma wymiar nie tylko poznawczy. Kontynuacja badań zapoczątkowanych w ocenianej pracy może bowiem przyczynić się do opracowania procedur profilaktycznych w odniesieniu do zakażeń bakteriami *Serratia* i poprzez to wyraźnie je ograniczyć.

Ocena strony formalnej pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest pokaźnym, liczącym 154 strony opracowaniem, wykonanym w oparciu o wyniki kilkuletnich badań autorki. W pracy zamieszczono 33 tabele oraz 23 ryciny, na które składa się 6, często złożonych wykresów, 5 schematów oraz 12 zdjęć dokumentujących przeprowadzone badania. Rozprawa została podzielona na 19 rozdziałów. Przedstawiono w nich przegląd literatury, cel pracy, opis materiałów i metod badawczych, omówienie wyników badań, ich podsumowanie, wnioski, dyskusję, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz spis literatury. Oprócz tego w rozprawie podano wykaz skrótów, tabel i rycin.

Zauważam jednak, że niektóre rozdziały typowe dla prac doktorskich, nie zostały wyraźnie wydzielone. Przykładowo, w rozprawie nie wyodrębniono w postaci niezależnego zapisu, rozdziału pt. przegląd literatury lub wprowadzenie. Wyniki studiów literaturowych przestawiono natomiast w dziewięciu rozdziałach, które pod względem strukturalnym są równoważne, takim rozdziałom jak: wyniki, dyskusja czy wnioski. Opis materiałów i metod badawczych jest także podzielony na dwa niezależne, duże rozdziały. Taki układ pracy w mojej ocenie jest mało przejrzysty. W pracy nietypowa, i poprzez to trochę dyskusyjna, jest też kolejność rozdziałów. Przykładowo, rozdział pt. „Podsumowanie pracy" zamieszono przed rozdziałem „Wnioski", a wnioski podano przed dyskusją wyników. Poza tym, dla większej czytelności, streszczenie pracy lepiej było zamieścić na początku całego manuskryptu. W nienumerowanym rozdziale pt. „Wykaz skrótów" znalazło się aż 170 rekordów/notacji, według mnie nie zawsze potrzebnych. Wiele z nich, jak np. DNA, RNA, PCR, Tab. itp. nie wymagało wyjaśnienia. Ponadto szereg skrótów odnosi się do nazw związków, które zostały wyjaśnione w tekście pracy i były użyte w niej tylko jeden raz. Przewodnik do nich nie był zatem konieczny. W wykazie powinny znaleźć się natomiast pominięte skróty tj. L-OAg, L-MW-OAg oraz skróty utworzone na potrzeby pracy (np. DNASE, LIP, GEL).

W pracy zacytowano 168 pozycji literaturowych w większości anglojęzycznych z ostatniej dekady. Pozycje bibliograficzne są merytoryczne właściwe i dobrze dobrane, z uwzględnieniem najważniejszych pozycji literatury, tak zagranicznej, jak i krajowej. Odnośniki literaturowe są umieszczone prawidłowo. Tytuł pracy jest zwięzły. Można go było jednak jeszcze bardziej doprecyzować i pokazać w nim również godną podziwu pracę doktorantki związaną z izolacją i identyfikacją przedmiotowych szczepów. Geneza pracy jest dobrze wyjaśniona i bezpośrednio powiązana z celem/ami badań. Omówienie wyników i ich dyskusja są poprawne, choć trochę schematyczne. Rozprawa stanowi zwartą całość i jest dobrze przygotowana od strony graficznej i redakcyjnej. Co więcej, najważniejsze wyniki, osiągnięcia i konkluzje zostały w niej wyraźnie podkreślone.

Oceniana rozprawa spełnia zatem wymagania formalne stawiane pracom dysertacyjnym na stopień naukowy doktora, tj. ma charakter eksperymentalny i zawiera komplet wymaganych rozdziałów. Rozdziały te są jednak wydzielone i ułożone w niestandardowy sposób.

Ocena merytoryczna pracy

Recenzowana praca autorstwa mgr Gabrieli Cieniuch dotyczy identyfikacji pałeczek *Serratia* wyizolowanych od zwierząt wolnożyjących i hodowlanych oraz oceny ich potencjalnej wirulencji. Pracę rozpoczyna 32 stronicowy wstęp literaturowy, który doskonale wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy. Wstęp literaturowy zamieszczono w dziewięciu rozdziałach. Autorka scharakteryzowała w nim pałeczki *Serratia*, zwracając szczególną uwagę na ich chorobotwórczość w stosunku do zwierząt i ludzi. Zaakcentowała w nim również problemy związane z opornością przedmiotowych bakterii na antybiotyki, w tym ich wieloantybiotykoopornością. Dokładnie omówiła też czynniki wirulencji *Serratia* oraz ich rolę w patogenezie. Oprócz tego przedstawiła metody analityczne wykorzystywane w diagnostyce *Serratia*. Ze względu na tematykę badań te rozdziały pracy uważam za szczególnie interesujące, wartościowe i oryginalne. We wstępie literaturowym autorka wiele miejsca poświęciła również omówieniu zagrożeń związanych z nosicielstwem badanych bakterii, wskazując poprzez to na potrzebę ich monitorowania. Doskonale opisała przypadki infekcji bakteriami *Serratia* oraz wyniki przeprowadzonych dochodzeń epidemicznych. W ten sposób pokazała skalę i złożoność problemów zawiązanych z zakażeniami tymi bakteriami. Niepełne dane na temat źródeł oraz dróg transmisji *Serratia*, w połączeniu z informacjami wskazującymi na możliwość występowania tych bakterii w środowisku szpitalnym, dodatkowo podkreśliły znaczenie jej badań. Dopracowanie procedury wykrywania bakterii *Serratia* oraz oszacowanie zagrożeń związanych z ich występowaniem u wybranych zwierząt, stało się też ważnym celem jej badań.

Treść całego przeglądu literaturowego wskazuje na doskonałe przygotowanie merytoryczne doktorantki. Poza tym, dzięki dogłębnemu przeanalizowaniu literatury światowej, możliwe było dobre zaplanowanie zasadniczych badań. Badania te obejmowały: izolację i identyfikację *Serratia*, a następnie detekcję wybranych czynników ich wirulencji. W ramach pracy udoskonalono też procedurę wykrywania/izolacji *Serratia*. Oceniono jej selektywność w odniesieniu do izolacji przedmiotowych bakterii z materiałów odzwierzęcych. Szczepy o potwierdzonej przynależności do rodzaju *Serratia* pogrupowano następnie pod względem wykrytych czynników wirulencji. Gigantyczna praca jaką włożyła doktorantka w przygotowanie materiału do zasadniczych badań, budzi mój szczery podziw.

Cele badań, których zdefiniowano aż sześć, są poprawne choć w mojej ocenie mógłby bardziej doprecyzowane. Przykładowo, znajdujące się w rozdziale „cele pracy doktorskiej" oraz pojawiające się także wielokrotnie w innych częściach pracy określenia: „opracowanie metodologii izolacji materiału odzwierzęcego w kierunku pałeczek *Serratia*", jest trochę myślące. Sugeruje bowiem, że doktorantka opracowywała procedurę izolacji materiałów biologicznych, w celu ich dalszej diagnostyki w kierunku obecności *Serratia*. Tymczasem doktorantka opracowywała procedurę pozwalającą na izolację *Serratia* z wymazów pobranych do zwierząt. Niejednoznaczne jest też określenie „częstość występowania *Serratia* w izolatach pozyskanych od ...". Według mnie ono dużym skrótem myślowym, trochę zmieniającym znaczenie pojęcia izolat. W rzeczywistości doktorantka określała jaki odsetek wyizolowanych szczepów stanowią *Serratia* (częstość występowania *Serratia* wśród wyizolowanych szczepów). Ponadto, w celu pracy nie wspomniano o bardzo ważnej i jednocześnie zasługujące na szczególne wyróżnienie kwestii, jaką była identyfikacja bakterii *Serratia*. Dla większej przejrzystości, w rozdziale „cele pracy doktorskiej" można było dodatkowo podać zadania badawcze, świetnie sformułowane choćby w streszczeniu. Oczywiście te drobne niedociągnięcia nie miały najmniejszego wpływu na przebieg zasadniczych badań, które zostały prawidłowo zaplanowane oraz wykonane z wykorzystaniem dobrze dobranych i nowoczesnych narzędzi, adekwatnych do celu badań.

Doktorantka bakterie *Serratia* izolowała z wykorzystaniem klasycznych metod mikrobiologicznych. Do ich identyfikacji stosowała metodę MALDI-TOF. Geny kodujące wybrane czynniki wirulencji wykrywała metodą PCR, a typ O-swoistego łańcucha LPS określała na podstawie wyników elektroforezy SDS-PAGE. Ponadto netodami biochemicznymi (z wykorzystaniem dobrze dobranych podłoży) dokonywała detekcji DNazy, lipazy oraz żelatynazy.

Opis ww. metod analitycznych jest dokładny, choć w niektórych fragmentach według mnie przydałyby się jeszcze dodatkowe odwołania literaturowe. Wtedy prawdopodobnie część moich uwag nie miałaby miejsca. W rozdziale „Metody" dostrzegam drobne nieścisłości. Dotyczą one np. pożywek stosowanych do detekcji deoksyrybonukleazy, lipazy i żetatynazy. Nazwy pożywek podane w rozdziale 12.3 różnią się od wypunktowanych w tabeli 5 („Wykaz podłóż wykorzystanych w realizacji badań"). Z informacji zawartych w rozdziale 12.3 nie wynika też jednoznacznie jaki indykator użyto do detekcji deoksyrybonukleazy. Do oznaczenia liczebności komórek *Serratia* poddanych działaniu ludzkiej surowicy (NHS) wykorzystano według mnie, niekonwencjonalną metodę – „metodę spotową", nazywaną też przez autorkę „metodą nakropień". Patrząc na załączoną w pracy dokumentację fotograficzną (Rycina 20) oraz porównując ją z danymi zawartymi w tabelach 30 i 31, zastanawiam się w jaki sposób otrzymano tak dużą dokładność oznaczeń oraz dlaczego wybrano taką właśnie modyfikację metody posiewów ilościowych (czy była ona równie dokładna?). Nie do końca jasne jest też jaką objętość materiału pobierano do wykonania rozcieńczeń dziesiętnych - 100 µl (str. 68), czy 50 µl (str. 105). Ciekawi mnie również sposób przygotowania szczepów do przechowywania w temp. -70°C (takiej informacji brakuje w pracy) oraz czy tak przechowywane szczepy były stabilne (czy zaobserwowano ich zmienność?). W metodyce szczegółowo opisano procedurę izolacji LPS. Nie podano natomiast na czym polegała dalsza analiza obrazów elektroforezy SDS-PAGE jego O-swoistego łańcucha (na co zwracano uwagę podczas odczytów?). Szkoda, że w skrupulatnie przygotowanych tabelach, nie podano informacji o tym ile kultur wyizolowanych do jednego zwierzęcia wybierano do identyfikacji. Bez tych informacji trudno mi jest ocenić w jakim stopniu wyniki izolacji mają przełożenie na częstość występowania *Serratia* u badanych zwierząt. Zapisy w pracy – str. 100 „W przypadku braku występowania w obrębie danego profilu izolatów od różnych zwierząt do badania wyselekcjonowano izolaty od jednego zwierzęcia", wskazują, że takie kryterium było brane pod uwagę. Dodatkowo potwierdzają to choćby wnioski str. 125 „Pałeczki *S. liquefaciens* występowały u wszystkich badanych zwierząt wolno żyjących i gospodarskich". Choć w tym przypadku akurat mam wątpliwości co do słuszności tego stwierdzenia, gdyż ilość wykrytych szczepów *S. liquefaciens* była dużo mniejsza od ilości pobranych wymazów, czyli badanych zwierząt.

Poczynione przeze mnie uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości strony metodycznej pracy; nie negują w żaden sposób prawidłowości wykonania badań w oparciu o przedstawiona metodykę. Mają jedynie na celu jej doprecyzowanie oraz wyjaśnienie niektórych kwestii.

Rezultaty badań będących podstawą dysertacji, zostały przedstawione w 22 tabelach oraz na 9 fotografiach i 6 wykresach, złożonych w sumie z 43 mniejszych. Zauważam jednak, że w tabelach 30-32 oraz na wykresach oznaczonych jako Ryc. 21 i 22 podano te same dane. Zestawiono je również w zbiorczej formie na Ryc. 23. Dodatkowo na rycinach 21 i 22 zamieszczono niestandardowe i w żaden sposób nie zdefiniowane w pracy słupki błędów, których nie zaznaczono już na rycinie 23. Ponadto, z uwagi na różną skalę wykresów porównywanie wyników „przeżywalności" wybranych szczepów w NHS jest utrudnione. Poprzez to również w niektórych przypadkach, wielkość słupków błędów nie odpowiada ich rzeczywistej wielkości (jest „zniekształcona"). Poza tym, definicja przeżywalności podana w pracy na stronie 107 „...przeżywalność wyrażona w procentach określająca zdolność

namnażania się badanych szczepów ..." całkowicie zmienia rzeczywiste rozumienie tego pojęcia. Czy przeżywalność może przekraczać 100%?

W rozdziale dotyczącym prezentacji wyników pierwszą część stanowi omówienie rezultatów izolacji 706 szczepów z 114 wymazów pobranych z tusz krów i świń domowych, a następie ich identyfikacji. Identyfikacji poddano również 542 szczepy wyizolowane z tusz dzików i saren w ramach innych prac prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Ze względu na odnotowany w nich niski współczynnik wykrywania/izolacji *Serratia*, doktorantka postanowiła najpierw dopracować procedurę detekcji tych bakterii. Zaproponowała uzupełnienie dotychczas stosowanej procedury o etap namnażania selektywnego w podłożu Nutrient Broth z dodatkiem antybiotyków (cefsulodyny, irgasanu i nowobiocyny). Jako źródło antybiotyków wykorzystała *Yersinia* CIN Supplement. Zaproponowane rozwiązanie jest trafne i absolutnie oryginalne. Jego wprowadzenie wymagało od doktorantki dobrej orientacji w zakresie warunków wzrostu *Serratia* oraz mikrobioty towarzyszącej, zwłaszcza bardzo licznie występujących w analizowanych wymazach innych bakterii gramujemnych. Było ono za pewne poprzedzone wieloma badaniami wstępnymi. Sądzę, że do jego powstania, przyczyniło się też doświadczenie zdobyte przez doktorantkę w pracach nad izolacją *Yersinia*. Ogromna praca związana ze zabieraniem materiału do badań od dzików i saren, oraz początkowy brak zadawalających efektów izolacji *Serratia*, nie zniechęciły doktorantki. Wręcz przeciwnie były źródłem zaproponowanych przez nią nowych rozwiązań w zakresie ich izolacji. Dodatkowo by jeszcze bardziej zwiększyć prawdopodobieństwo izolacji *Serratia*, doktorantka zaproponowała prowadzenie hodowli izolacyjnych równolegle na dwóch podłożach – DNAse Agar i CT Agar. Szkoda, że w tym miejscu nie przedstawiła wyników badań porównawczych (metoda tradycyjna=wyjściowa vs. autorska=nowa). Takie wyniki podniosły by jeszcze bardziej rangę jej dokonań. Wieloetapowe i pracochłonne było nie tylko samo przygotowanie materiału do izolacji. Domyślam się, że także i sama izolacja *Serratia* była trudna, choćby z uwagi na duże podobieństwo morfologiczne kolonii *Serratia* i innych, niestety nadal rosnących z nimi bakterii (*Pseudomonas, Citrobacter, Enterobacter* czy *Yersinia*). Sam proces wyprowadzania czystych kultur był też zapewne wieloetapowy. Z doświadczenia wiem, że przeanalizowanie tak dużej ilości materiału, wymagało ogromnej pracy, dokładności, skrupulatności i cierpliwości, co tym bardziej doceniam. Badania oparte na materiale biologicznym charakteryzują się przy tym dużą zmienności i nieprzewidywalnością. Dlatego w tym miejscu ciekawią mnie kwestie dotyczące stabilności badanych bakterii. Czy w trakcie pasażowania zaobserwowano ich zmienność (np. barwy, intensywności wzrostu)?

Ostatecznie doktorantce udało się otrzymać 1248 czystych kultur i spośród nich 1138 (ponad 91%) przyporządkować do gatunku, a jeśli nie było to możliwe do rodzaju. Praca włożona w identyfikację tak dużej ilości kultur jest naprawdę imponująca. W trakcie analizy materiału wynikowego mgr G. Cieniuch dokonała wielu interesujących odkryć. Stwierdziła, że poszukiwane bakterie *Serratia* stanowiły przeciętnie 20% wyizolowanych szczepów i w większości analizowanych materiałów były dominującą grupą oznaczonych bakterii gramujemnych. Dodatkowo udało jej się ustalić, że szczepy zidentyfikowane jako *Serratia* były przedstawicielami kilku gatunków, spośród których najliczniej reprezentowany (najczęściej identyfikowany) był gatunek *S. liquefaciens*. We wszystkich analizowanych próbkach, z wyjątkiem tych pobranych od saren, wykryto też obecność *S. marcescens*. Wyniki przeprowadzonych identyfikacji nie tylko pozwoliły na wykrycie *Serratia*, ale i pokazały jak dużą bioróżnorodnością charakteryzuje się mikrobiota jamy nosowo-gardłowej badanych zwierząt, a w przypadku krów i świń domowych, również ich odbytnicy. Dodatkowo unaoczniły wyraźne różnice mikrobioty różnych gatunków zwierząt. Zastanawiam się, czy tak samo zróżnicowany profil miała mikrobiota zwierząt należących do

tego samego gatunku oraz jakie czynniki mogły go kształtować? Proszę o komentarz w tej sprawie.

Spośród zidentyfikowanych szczepów *Serratia* do dalszych badań wybrano 132 szczepy *S. liquefaciens* i 25 szczepów *S. marcescens*. Szczepy te przebrano na poziomie feno- lub genotypowym pod kątem obecności wybranych czynników wirulencji. Najpierw stosując testy biochemiczne oceniono ich zdolność do sekrecji enzymów związanych z wirulencją *Serratia* takich jak: DNaza, lipaza i żelatynaza. Ustalono, że wszystkie szczepy *S. marcescens* oraz *S. liquefacies* wyizolowane do świń domowych wytarzały badane enzymy. Szczepy pozbawione zdolności syntezy ww. enzymów stanowiły niewielki odsetek badanej populacji (były izolowane sporadycznie do pozostałych zwierząt). Co ciekawe, przeciętnie 20% szczepów zarówno *S. liquefaciens* jak i *S. mercescens* wykazywało równocześnie aktywność hemolityczną. Szczepy o potwierdzonej zdolności do syntezy oznaczanych enzymów (119 szczepów) przebadano dalej pod kątem obecności genów kodujących fimbrie typu I (*fimA*), fosfolipazy A (*phlA, phlB*) oraz białka ShlA i ShlB toksyny hemolitycznej (*shlA, shlB*). Otrzymane, bardzo interesujące i zróżnicowane profile obecności genów wirulencji, stały się jednocześnie podstawą wnioskowania dotyczącego zróżnicowania potencjału chorobotwórczego odzwierzęcych szczepów *Serratia*. Dodatkowo ich wykrycie pozwoliło na ustalenie, że potencjał chorobotwórczy *Serratia* jest cechą szczepową, niezależną od ich pochodzenia (nie stwierdzono korelacji pomiędzy występowaniem badanych czynników wirulencji, a miejscem bytowania otrzymanych izolatów). Wysoce oryginalny charakter miały też kolejne badania doktorantki, których celem było określenie typu O-swoistego łańcucha LPS. Wykrycie u wszystkich badanych szczepów gładkiego LPS skłoniło doktorantkę do podjęcia dalszych badań. W ramach nich zbadano wrażliwość wybranych, tym razem dziesięciu szczepów *Serratia* na NHS. Niestety kryteria ich wyboru nie do końca są dla mnie zrozumiałe. W analizie wyników oporności/wrażliwości szczepów na działanie NHS doktorantka zwróciła uwagę głównie uwagę pochodzenie szczepów, pominęła natomiast kwestie zawiązane z profilem/budową LPS. Przygotowując materiał do publikacji warto uwzględnić również te dane.

Uzyskane rezultaty mgr G. Cieniuch poddała analizie w odniesieniu do dostępnej literatury. Zamieściła również komentarz dotyczący genezy badań. Z merytorycznego punktu widzenia, dyskusja została przeprowadzona w sposób poprawny, logiczny i rzeczowy. Doktorantka nawiązała w niej do wyników badań innych autorów o podobnym charakterze, uwypuklając przy tym (czasami nawet nadmiernie) niekwestionowane elementy nowatorskie swojej pracy. Szkoda tylko, że w rozdziale pt. „Dyskusja" nie zarysowała dalszego kierunku badań związanych z *Serratia*. Oczywiście w żaden sposób nie umniejsza to wartości jej dokonań, które oceniam wysoko.

Podsumowaniem dysertacji jest 11 wniosków, będących bezpośrednią odpowiedzią na przedstawione cele badań. W mojej ocenie niektóre wnioski mają jednak charakter stwierdzeń i można byłoby je pominąć, inne natomiast połączyć lub podać w bardziej syntetycznej formie. Poza tym według mnie, we wnioskach pominięto wiele ciekawych wątków, np. związanych z oceną zagrożenia jakie stanowią zidentyfikowane szczepy.

Mam też kilka uwag dotyczących strony językowej pracy. W całej pracy personifikowane są drobnoustroje, czynniki wirulencji, związki chemiczne itp. Przejawem tego są przypisywane im określenia np. *Serratia* mają, posiadają itp., (poprawna forma: odznaczają się, charakteryzują się, wykazują itd.). Czasami składnia zdań mogłaby odwrotna; zyskałaby na tym czytelność przekazu. W pracy dostrzegam też, wiele potocznych i poprzez to mało precyzyjnych określeń np. „ mieszanie z użyciem wortexa typu Vortex", „mieszanie pipetą poprzez wpuszczanie i wypuszczanie" itp. Poza tym niektóre określenia, np. „ ocena makromorfologii izolatów bakteryjnych" (zamiast, np. ocena morfologii kolonii wyizolowanych szczepów) są trochę niezręczne.

Na koniec pragnę jeszcze raz zaznaczyć, że wszystkie poczynione przeze mnie uwagi nie dotyczą kwestii o istotnym znaczeniu merytorycznym. Mają one jedynie formę luźnych refleksji, sugestii i pytań. Poprzez nie, chciałam wywołać dyskusję z doktorantką oraz pomóc jej w jeszcze lepszym opracowaniu bardzo dobrego materiału wynikowego.

Reasumując stwierdzam, że oceniana rozprawa zawiera wiele elementów nowości naukowej, które wyraźnie rozszerzają wiedzę na temat potencjału chorobotwórczego odzwierzęcych pałeczek *Serratia*. Treść całej pracy unaocznia zagrożenia związane występowaniem tych bakterii w organizmach zwierząt oraz możliwością ich transmisji do organizmu człowieka (ostrzega przed nowymi zagrożeniami mikrobiologicznymi, pokazuje ich skalę i możliwe konsekwencje). Wskazuje na potrzebę analizowania źródeł oraz dróg transmisji *Serratia* oraz podejmowania działań ograniczających ich niekontrolowane rozprzestrzenianie się. Z uwagi na wykazaną w pracy powszechność występowania *Serratia* u zwierząt, działania monitoringowe prowadzone na fermach, w ubojniach oraz zakładach przetwórstwa mięsnego warto rozszerzyć o *Serratia*. Wyniki zamieszczone w pracy w pełni uzasadniają celowość podnajmowania tak dalekosiężnych działań. Oprócz niekwestionowanych walorów poznawczych praca mgr G. Ciniuch ma jeszcze jeden ogromy atut. Dzięki niej powstała unikalna w skali światowej kolekcja *Serratia*. Składnikami kolekcji utworzonej przez mgr G. Cieniuch jest ponad sto odzwierzęcych szczepów *Serratia*, skatalogowanych pod względem potencjalnej wirulencji. Kolekcja ta otwiera drogę do prowadzenia wielu intersujących badań. Dzięki niej możliwe jest np. badanie czynników determinujących wirulencję *Serratia*, ich zdolność do kolonizacji powierzchni czy oporność na działanie różnych czynników fizykochemicznych. Kolekcja, będąca wartością dodana do ocenianej pracy, może zatem przyczynić się do opracowanie metod zwalczania *Serratia* i poprzez to zdusić w zarodku możliwość kolejnych epidemii. W tym kontekście badania zapoczątkowane w ocenianej pracy w przyszłości mogą mieć również wymiar społeczny.

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska pani mgr Gabrieli Cieniuch pt. „Charakterystyka wybranych czynników wirulencji odzwierzęcych pałeczek *Serratia*", spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne przy Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o **dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**