



Prof. dr hab. Kinga Wieczorek,
Zakład Bezpieczeństwa Żywności
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

OCENA

rozprawy doktorskiej **mgr Jakuba Korkusa**
pt. „*Rola genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu*
Campylobacter jejuni”

przygotowanej w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Ewy Wałeckiej-Zacharskiej prof. UPWr

Podstawę prawną do wykonania recenzji rozprawy doktorskiej stanowi uchwała Rady Dyscypliny
Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 25 czerwca 2024 r.

Uzasadnienie wyboru tematu rozprawy doktorskiej i oryginalności problemu badawczego

Campylobacter jejuni jest od wielu lat najczęstszą przyczyną pokarmowych zakażeń bakteryjnych przenoszonych na ludzi za pośrednictwem żywności, głównie mięsa drobiowego. Bakterie te są często elementem flory komensalnej drobiu i z tego względu podczas uboju i przetwarzania mięsa może dochodzić do kontaminacji tusz. W związku z powyższym podejmowane są działania mające na celu ograniczenie występowania *Campylobacter* w łańcuchu produkcji drobiowej, co w znaczący sposób wpływa na zmniejszenie liczby zachorowań na kampylobakteriozę u ludzi. Pomimo dużej wrażliwości tych bakterii na czynniki środowiskowe, w tym tlen, mogą one przetrwać w niekorzystnych warunkach. Ma to wpływ na ich częste występowanie w mięsnych produktach drobiowych dostępnych w sprzedaży detalicznej. Dodatkowo, szereg opracowywanych i wdrażanych strategii mających na celu eliminację lub ograniczenie poziomu występowania *Campylobacter* na różnych etapach produkcji drobiowej nie jest skuteczne w wystarczającym stopniu, co stanowi zagrożenie dla

konsumentów związane z tym patogenem. Jedyną z przyczyn tych niepowodzeń wydaje się być zdolność bakterii do tworzenia biofilmu, która jest kluczową cechą pozwalającą im na przetrwanie stresu środowiskowego. Badania wskazują, że *Campylobacter* tworzy tego struktury na różnorodnych powierzchniach abiotycznych, w tym w systemach nawadniających oraz na stali nierdzewnej powszechnie stosowanej w zakładach przetwórczych. W porównaniu z innymi patogenami, takimi jak na przykład *Listeria monocytogenes* mechanizmy genetyczne tworzenia biofilmu przez *Campylobacter* są nadal niewyjaśnione w wystarczającym stopniu, co utrudnia skuteczną eliminację tych bakterii. Ze względu na powyższe aspekty, temat badań podjętych przez Doktoranta jest w pełni uzasadniony i bardzo dobrze wpisuje się w aktualne problemy naukowe. Ponadto, biorąc pod uwagę ograniczony zakres dostępnych prac z tego zakresu, praca ma istotny charakter nowatorski i duże walory poznawcze.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się ze wszystkich niezbędnych w tego typu opracowaniach elementów. Doktorant umieścił w niej 7 rozdziałów, w tym wstęp, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję i wnioski, a także wykaz skrótów, a także streszczenia w języku polskim i angielskim. Łącznie dysertacja liczy 97 stron maszynopisu, 14 rycin oraz 37 tabel, umieszczonych głównie w rozdziale „Materiały i metody”. Układ rozprawy jest logiczny i bardzo przejrzysty, a jej tytuł w pełni odzwierciedla treści zawarte w pracy doktorskiej.

We wstępie mgr Jakub Korkus w sposób syntetyczny przedstawia zagadnienia związane z tematyką prowadzonych badań, w tym charakterystykę rodzaju *Campylobacter* oraz epidemiologię kamylobakteriozy. Doktorant omawia także patogenezę tej choroby skupiając się szczególnie na czynnikach warunkujących adhezję i inwazję bakterii do docelowych komórek. W dalszej części tego rozdziału charakteryzuje natomiast biofilm bakteryjny, a także mechanizmy jego tworzenia przez *C. jejuni* w oparciu o aktualny stan wiedzy. Zgadzam się z mgr Jakubem Korkusem, że jest on jeszcze nie w pełni poznany. Doktorant opisał cztery główne grupy genów odpowiedzialne za powstawanie biofilmu, czyli markery uczestniczące w ruchu i chemotaksji, a także odpowiedzialne za modyfikacje białek struktur powierzchniowych oraz regulujące odpowiedź na stres komórki bakteryjnej. W ostatniej części tego rozdziału Doktorant omawia klasy transpozonów prokariotycznych oraz ich zastosowanie w mutagenezie. Wstęp jest napisany prawidłowo i wskazuje na dobrą znajomość przez Doktoranta omawianych zagadnień. Podsumowanie aktualnego stanu wiedzy dobrze uzasadnia potrzebę podjęcia badań

przedstawionych w dalszej części rozprawy doktorskiej. Jednak ze względu na temat pracy, czyli rolę genów w procesie tworzenia biofilmu *C. jejuni* uważam, że zbyt mało jest informacji na ten temat nawet biorąc pod uwagę fakt, że jest to zagadnienie jeszcze stosunkowo w niewielkim stopniu poznane. Zamiast Tabeli 1 opisującej gatunki *Campylobacter*, co tylko pośrednio związane jest z tematyką pracy zamieściłabym tabelę dotyczącą dotychczas poznanych genów i ich funkcji związanych z tworzeniem biofilmu przez te bakterie. Co prawda, opis wybranych markerów genetycznych oraz rycina dotycząca tego tematu jest zawarty w podrozdziale 1.5. jednak w mojej opinii można by ten temat omówić szerzej szczególnie pod kątem genów odpowiedzialnych za stres środowiskowy, na przykład oksydacyjny, powiązanych z tworzeniem biofilmu.

W kolejnej części pracy Doktorant jasno sprecyzował główny cel podjętych badań, którym jest ocena roli genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu przez *C. jejuni*. Dodatkowo, został on jeszcze raz uzasadniony oraz podzielony 3 cele szczegółowe będące logicznym odzwierciedleniem zaplanowanych badań, którymi są losowa mutageneza, konstrukcja mutantów delecyjnych oraz ocena ich zdolności do tworzenia biofilmu. W mojej opinii realizacja sformułowanych celów szczegółowych umożliwi osiągnięcie celu głównego zaplanowanych przez mgr Jakuba Korkusa badań.

W następnej części dysertacji Doktorant w sposób bardzo dokładny opisał zastosowane materiały, w tym odczynniki chemiczne czy podłoża mikrobiologiczne. Przedstawił także sekwencje starterów użytych w badaniach oraz wykorzystane w pracy szczepy bakteryjne i plazmidy, aparaturę oraz zastosowane oprogramowanie. W rozdziale „Materiały i metody” mgr Jakub Korkus opisał szczegółowo i chronologicznie metodologię badań. Omówienie dotyczące konstrukcji mutantów delecyjnych oraz ich komplementacji jest dobrze zaprojektowane i czytelnie zaprezentowane czemu służą liczne tabele i rycina. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant z dużą znajomością zagadnienia zrealizował wieloetapowy proces związany z realizacją celu pracy. Sprawnie posługuje się różnorodnymi technikami, w tym elektroporacją, koniugacją, izolacją materiału genetycznego czy testami PCR. W celu wizualizacji biofilmu mgr Jakub Korkus zastosował m.in. takie techniki jak skaningową mikroskopię elektronową (SEM), konfokalną laserową mikroskopię skaningową (CLSM) oraz system mikroprzepływowy BioFlux 1000z. Na zakończenie tego rozdziału Doktorant przedstawił metody statystyczne analizy wyników, w tym te wykorzystane do oznaczenia różnic w tworzeniu biofilmu między mutantami, szczepem dzikim i komplementowanymi mutantami. Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że została ona opracowana

starannie i zawiera wszelkie niezbędne informacje związane z wykonaniem badań. Należy także dodać, że w badaniach wykorzystano różne, dobrze dobrane i wzajemnie uzupełniające się techniki co umożliwi wielowymiarową interpretację uzyskanych wyników i w znaczący sposób podnosi wartość pracy. Rozdział „Materiały i metody” jest najobszerniejszą częścią dysertacji co jest uzasadnione gdyż zaplanowane badania są wieloetapowe i wymagają zastosowania różnorodnych metod.

W rozdziale „Wyniki”, na 13 stronach Doktorant w sposób bardzo przejrzysty przedstawił rezultaty swoich badań. W pierwszej kolejności zaprezentował wyniki losowej mutagenезy przy użyciu transpozonu. W jej wyniku otrzymał mutanty, z których część charakteryzowała się obniżoną zdolnością tworzenia biofilmu. Po odrzuceniu tych, w których transpozon wbudował się do genów już wcześniej zidentyfikowanych jako wpływające na zdolność bakterii do produkcji biofilmu Doktorant skoncentrował się na dwóch mutantach genów dotychczas nie zidentyfikowanych jako uczestniczące w tym procesie. Jest to wybór jak najbardziej uzasadniony. Kolejnym etapem prowadzonych badań było ponowne wprowadzenie kopi genów do mutantów i ocena zdolności tworzenia biofilmu zarówno przez nie jak i wspomniane wcześniej mutanty w stosunku do szczepu dzikiego przy pomocy barwienia fioletem krystalicznym. Analiza statystyczna uzyskanych wyników jednoznacznie wykazała, że mutanty *C. jejuni* dla genów *cydB* oraz *hydC* charakteryzują się niższą produkcją biofilmu. Dane te uwiarygodniono przeprowadzając trzy niezależne eksperymenty. W dalszej części prowadzonych badań mgr Jakub Korkus dokonał wizualizacji biofilmu stosując SEM. W jej wyniku stwierdził, że różniły się one w zależności szczepu *C. jejuni*, który je wytwarzał. Mutanty dwóch analizowanych genów wytwarzały biofilmy różniące się zarówno od szczepów dzikich jak i mutantów komplementacyjnych. Szczególnie mutant w genie *cydB* tworzył „słabszy, niejednorodny biofilm o nieregularnej strukturze”. Obserwacje te Doktorant poparł zdjęciami umieszczonymi na ryc. 10. Natomiast przy zastosowaniu CLSM mgr Jakub Korkus ocenił procentowy udział żywych i martwych komórek w biofilmie i nie odnotował istotnych różnic w żywotności pomiędzy poszczególnymi szczepami *C. jejuni*. Jednak zaobserwował, że mutanty genów *cydB* oraz *hydC* wytwarzają biofilm o mniejszej powierzchni. Te doświadczenia także udokumentowano w postaci czytelnych zdjęć i ryciny. Doktorant badał także dynamikę tworzenia biofilmu, stwierdzając, że mutanty charakteryzują się jego ograniczonym przyrostem. Kolejne eksperymenty wykazały, że mutacje w genach *cydB* oraz *hydC* nie mają wpływu na ruchliwość i tempo namnażania się komórek bakteryjnych. W tym przypadku również wyniki badań zostały udokumentowane bardzo czytelnymi i dobrze

opisanymi rycinami. Podsumowując, rozdział ten jest napisany poprawnie i wskazuje, że Doktorant posiada umiejętności prawidłowego opisywania, prezentowania i analizowania otrzymanych wyników. Rozdział „Wyniki” jest bardzo spójny i świadczy o dobrych zdolnościach analitycznych mgr Jakuba Korkusa. Dodatkowo, dokumentacja prowadzonych badań w postaci zdjęć i rycin została także przedstawiona w sposób bardzo staranny.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant odnosi się jeszcze raz do konieczności podjęcia badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Wskazuje m.in. na istotność *C. jejuni* jako bakteryjnego czynnika będącego obecnie najczęstszą przyczyną zatruc pokarmowych u ludzi na świecie. W tym kontekście badania nad mechanizmami tworzenia biofilmu są niezwykle istotne zwłaszcza, że w porównaniu z innymi bakteriami, proces ten w odniesieniu do *Campylobacter* jest stosunkowo mało poznany. W dalszej części tego rozdziału mgr Jakub Korkus opisuje podstawową rolę genów *cydB* i *hydC*, a następnie odnosi się do przeprowadzonych w niniejszej rozprawie doktorskiej badań, w których wykazał udział tych markerów genetycznych w procesie tworzenia biofilmu przez *C. jejuni*. Ponadto Doktorant wskazuje, że mutageneza z wykorzystaniem transpozonu EZ-Tn5 jest skutecznym i wiarygodnym narzędziem do identyfikacji genów co zostało także potwierdzone przez innych badaczy. W dyskusji zabrakło mi jednak szerszego odniesienia się do dostępnych badań z zakresu genetycznych aspektów tworzenia biofilmu przez *Campylobacter*. Rozumiem, że wiedza z tego zakresu jest dość ograniczona, ale myślę że można było ten temat omówić szerzej na przykład wskazując obszary do dalszych badań, na podstawie analiz przeprowadzonych dotychczas na innych bakteriach, co zostało tylko wspomniane w tym rozdziale.

Doktorant sformułował 4 wnioski końcowe, które bezpośrednio odnoszą się do wyników badań i świadczą o umiejętności ich prawidłowej analizy. Mam tylko wątpliwość czy brak wpływu delekcji genów na ruchliwość, żywotność i tempo wzrostu bakterii może być jednoznacznym dowodem na zaangażowanie tych markerów w procesie tworzenia biofilmu. Z wysuniętych przez mgr Jakub Korkusa wniosków wynika jasno, że cel badań, którym była ocena roli genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu przez *C. jejuni* został zrealizowany.

Pozostałe elementy rozprawy doktorskiej takie jak streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz literatury zostały przygotowane starannie i rzetelnie. Załączony wykaz literatury zawiera 173 dobrze dobrane i aktualne pozycje.

W nawiązaniu do tematyki przeprowadzonych badań prosiłabym o odniesienie się przez Doktoranta do następujących kwestii:

- Czy istnieją badania, w których została wykazana zależność pomiędzy obecnością genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz markerów wirulencji *C. jejuni*, a produkcją biofilmu przez te drobnoustroje ?
- Jak czynniki środowiskowe wpływają na produkcję biofilmu przez *Campylobacter* ?
- Które z substancji, szczególnie naturalnych, mogą być najskuteczniejsze do zwalczania biofilmu wytwarzanego przez *Campylobacter* w środowisku zakładu przetwórczego ?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, należy odnotować, że badania wykonane w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej odnoszą się do aktualnej tematyki badawczej i poszerzają wiedzę związaną z mechanizmami genetycznymi tworzenia biofilmu przez *C. jejuni*. Ponadto, jest to oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazujące na umiejętność samodzielnego prowadzenia badań przez Doktoranta, jego dobrą wiedzę teoretyczną, w prezentowanym obszarze oraz umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników. Zgłoszone we wcześniejszej części recenzji uwagi krytyczne nie mają zasadniczego wpływu na ogólną dobrą ocenę pracy. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr Jakuba Korkusa pt. „*Rola genów cydB i hydC w procesie tworzenia biofilmu Campylobacter jejuni*” odpowiada warunkom określonym w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i przekazuję Wysokiej Radzie Wydziału Dyscypliny Weterynaria UP we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Puławy, 5.09.2024.



prof. dr hab. Kinga Wieczorek