



Prof. dr hab. Andrzej Koncicki
Katedra Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 16.08.2024 r.

O C E N A

rozprawy doktorskiej **mgr Jakuba Korkusa** pt. „**Rola genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu *Campylobacter jejuni*” wykonanej w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Wałęckiej-Zacharskiej, prof. UPWr**

Podstawę formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej mgr Jakuba Korkusa stanowi pismo przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria, prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego (MDDD0000.4100.4.2024) z dnia 01 lipca 2023 r., zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Zakażenia drobnoustrojami z rodzaju *Campylobacter* spp. u ludzi stanowią poważny problem epidemiologiczny. Wywoływana przez te bakterie kamylobakterioza, która jest zoonozą, stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń i zatruc pokarmowych u ludzi (tzw. foodborne disease). Na ten problem zwraca szczególną uwagę Światowa Organizacja Zdrowia. W wielu krajach, jak USA, Anglia, Holandia, kraje skandynawskie, w których badania epidemiologiczne są prowadzone regularnie, zakażenia ludzi wywołane przez *Campylobacter* dominują obecnie nad infekcjami powodowanymi innymi patogenami, w tym pałeczkami *Salmonella* spp. Głównym źródłem zakażenia człowieka są produkty spożywcze pochodzenia zwierzęcego. Ta szczególna sytuacja epidemiologiczna wynika z faktu powszechnego występowania pałeczek *Campylobacter* spp. u różnych gatunków zwierząt, w tym zwierząt rzeźnych. Bakterie te bowiem wchodzą w skład mikroflory jelitowej zwierząt powodując u nich zwykle bezobjawowe nosicielstwo.

Campylobacter spp. mogą kolonizować przewód pokarmowy każdego gatunku zwierząt, jednak izolowane są najczęściej od ptaków. Dla tych termofilnych mikroorganizmów przewód pokarmowy ptaków jest bardzo „gościenny”, gdyż ptaki mają wyższą temperaturę wewnętrzną w porównaniu do innych gatunków zwierząt. Pomimo, że rodzaj *Campylobacter* (*C.*) w ogóle

obejmuje 45 gatunków, to dominującymi gatunkami u ptaków są *C. jejuni* i *C. coli*. To bezobjawowe zakażenie tymi bakteriami w ciągu kilku dni może rozprzestrzenić się na 100% ptaków w stadzie. Głównymi czynnikami ryzyka, które przyczyniają się do tak szybkiego rozprzestrzeniania się *Campylobacter* spp. w fermach intensywnego chowu drobiu, jest zanieczyszczone środowisko, pasza, woda, brak środków bezpieczeństwa biologicznego umożliwiających kontakt z dzikimi zwierzętami, owady, niewłaściwa dezynfekcja pomiędzy cyklami produkcyjnymi. Zakażenie może rozprzestrzeniać się zarówno poziomo, jak i pionowo poprzez jaja wylęgowe na potomstwo.

Głównym źródłem zakażenia człowieka jest żywność pochodzenia zwierzęcego, zwłaszcza drób, stąd wymienione wyżej dwa gatunki tej bakterii występujące u drobiu (*C. jejuni* i *C. coli*) są przyczyną ok. 90% zatruc pokarmowych. Dodatkowo duże zagrożenie dla zdrowia publicznego wiąże się z rosnącą opornością tych bakterii izolowanych zarówno od zwierząt, jak i ludzi na chemioterapeutyki. Do zakażenia ludzi dochodzi najczęściej po spożyciu świeżych lub niedopasteryzowanych zanieczyszczonych pałeczkami *Campylobacter* środków spożywczych. Tuszki drobiowe i ich narządy wewnętrzne ulegają zanieczyszczeniu w trakcie procesu uboju i obróbki poubojowej. Istnieje także możliwość przeniesienia tych bakterii z tuszek drobiowych na inne produkty spożywcze przechowywane w gospodarstwie domowym. Niehigieniczna obróbka mięsa czy niewłaściwa dystrybucja produktów drobiowych sprzyja kontaminacji krzyżowej produktów spożywczych. Zachorowania ludzi o charakterze epidemicznym związane są przede wszystkim z piciem mleka i wody zanieczyszczonej *Campylobacter* spp. a także, jak zaznaczono wyżej, ze spożyciem mięsa drobiowego (np. grillowanego) i jego przetworów.

Opisano wiele mechanizmów kolonizacji jelit przez *Campylobacter*, w tym zdolność ruchu, chemotaksję, adhezję, infekcję wewnątrzkomórkową, syntezę entero- i cytotoksyn, obecność białek szoku cieplnego i pomp efflux oraz zdolność do tworzenia biofilmu, który odgrywa kluczową rolę w przetrwaniu tych bakterii w środowisku. Bowiem pomimo, iż bakterie z rodzaju *Campylobacter* są z jednej strony bardzo wrażliwe na zmiany warunków środowiska, a z drugiej - mają duże wymagania bytowe, to jednak za sprawą tworzonego biofilmu z łatwością przeżywają w środowisku produkcji i przetwarzania żywności stwarzając poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. W świetle powyższego wybór tematu ocenianej rozprawy doktorskiej, która dotyczy bardzo istotnego zagadnienia jakim są badania nad zdolnością i mechanizmami tych bakterii do tworzenia biofilmu należy uznać za trafny i bardzo aktualny.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska posiada typowy układ dla tego typu opracowań na stopień naukowy. Jest przedstawiona na 97 stronach manuskryptu, podzielonych na dziewięć rozdziałów, poprzedzonych stroną tytułową i spisem treści w kolejności:

- wykaz używanych skrótów (2 strony),
- streszczenia w językach polskim i angielskim (po 2 strony),
- wstęp (15 stron),
- cel pracy (1 strona),
- materiały i metody (30 stron),
- wyniki (13 stron),
- dyskusja (5 stron),
- wnioski (w liczbie 4),
- bibliografia (172 pozycje).

Dokumentacja pracy przedstawiona jest na 5 rycinach i w 37 tabelach zamieszczonych w tekście manuskryptu. Zostały one opracowane bardzo starannie graficznie, przez co są czytelne. Pragnę jednak zauważyć, że brakuje tabeli 22 „Skład mieszaniny ligacyjnej”, chociaż Autor odwołuje się do niej na stronie 43 manuskryptu. Przegląd piśmiennictwa oparty jest na 172 starannie dobranych pozycjach, co świadczy o dojrzałości naukowej Autora dysertacji oraz o aktualności podjętych badań. Przedstawiona do oceny dysertacja napisana jest poprawnym językiem, z prawidłowym użyciem nazewnictwa fachowego.

W obszernym **wstępie**, po krótkim wprowadzeniu w problematykę zakażeń bakteryjnych przenoszonych przez żywność stanowiących istotny aspekt ochrony zdrowia publicznego w skali ogólnoswiatowej, Doktorant bardzo szczegółowo omawia epidemiologię i patogenezę zakażeń *C. jejuni* – czynnika etiologicznego kampylobakteriozy powodującej ostre zapalenie żołądka i jelit. W dalszej części tego rozdziału Doktorant przedstawił definicję biofilmu z etapami jego tworzenia oraz jego znaczenie w przemyśle spożywczym jako istotnego czynnika chroniącego bakterie przed działaniem zmiennych warunków środowiska zewnętrznego, w tym środków dezynfekcyjnych. Następnie Doktorant omówił rolę biofilmu *C. jejuni* w szerzeniu zakażeń na fermach drobiu i w transmisji tych bakterii z przewodu pokarmowego ubijanych ptaków na tuszkę oraz mechanizm tworzenia biofilmu. W tym ostatnim przypadku Autor dysertacji szczegółowo opisał rolę genów odpowiedzialnych za wirulencję i tworzenie biofilmu *C. jejuni*.

Wstęp, który z wielką przyjemnością dokładnie przeanalizowałem, stanowi logiczną i dobrze skomponowaną część pracy wprowadzającą szczegółowo w problematykę zakażeń bakteriami z rodzaju *Campylobacter* spp. u ludzi i zwierząt oraz rolę biofilmu tych bakterii w

etiopatogenezie zakażeń. Ta część dysertacji dowodzi bardzo dobrej znajomości przez Doktoranta problematyki oraz piśmiennictwa (w tym rozdziale zacytowano 151 pozycji oraz publikację Kim i wsp. 2015, której nie zamieszczono w wykazie, a pracę Svensson i wsp. 2014 zamieszczono dwukrotnie (poz. 146 i 147), co stanowi 88% ogólnej ich liczby). Analiza tego rozdziału wprowadza stopniowo, ale szczegółowo w zagadnienia, których dotyczy dysertacja. Z analizy cytowanego w tym rozdziale piśmiennictwa przekonywująco wynika również cel pracy.

Głównym **celem** pracy doktorskiej była ocena roli genów *cydB* i *hydC*, wytypowanych przy wykorzystaniu losowej mutagenyzy za pomocą transpozonu, w procesie tworzenia biofilmu przez *C. jejuni*. Cele te były realizowane w oparciu o trzy następujące zadania szczegółowe:

- 1) losowa mutagenyza za pomocą transpozonu w celu identyfikacji nowych genów uczestniczących w procesie tworzenia biofilmu u *C. jejuni*;
- 2) konstrukcja mutantów delecyjnych oraz komplementacja otrzymanych mutantów;
- 3) ocena zdolności tworzenia biofilmu oraz architektury biofilmu uzyskanych mutantów.

Kolejny rozdział to „**Materiały i metody**”, w którym Doktorant w formie tabelarycznej zestawiał wykorzystane w badaniach odczynniki chemiczne, enzymy, antybiotyki i chemioterapeutyki, bufony i roztwory, gotowe zestawy odczynników, podłoża mikrobiologiczne, oligonukleotydy, szczepy bakteryjne i plazmidy, oprogramowanie i aparaturę.

Następnie w podrozdziale „**Metody**” zamieszczono zwięzły opis badań laboratoryjnych (hodowla bakterii, przygotowanie komórek elektrokompetentnych *C. jejuni*, losowa mutagenyza za pomocą transpozonu, hodowla biofilmu *C. jejuni*, identyfikacja genów przerwanych przez transpozon, izolacja genomowego DNA, konstrukcja mutantów delecyjnych, otrzymanie plazmidów pJK101 i pJK102, pJK102 i pJK202 oraz pJK103 i pJK203, wprowadzenie zmutowanego allelu do *C. jejuni* DRH212, elektroporacja I i II, komplementacja otrzymanych mutantów, przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* DH5 α /pRK212.1, koniugacja *C. jejuni* z *E. coli*, colony PCR, izolacja plazmidów, sekwencjonowanie plazmidów, określenie zdolności tworzenia biofilmu uzyskanych mutantów w warunkach statycznych, określenie zdolności ruchu uzyskanych mutantów, krzywa wzrostu szczepu dzikiego, szczepów zmutowanych oraz szczepów po komplementacji, skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa (CLSM), analiza biofilmu za pomocą mikroprzepływowego BioFlux 1000z i analiza statystyczna. Wymienione metody świadczą o

bardzo dużym zakresie, skrupulatnie przeprowadzonych badań, wykonanych z zastosowaniem nowoczesnych technik, które wymagały od Doktoranta opanowania szerokiej gamy metod badawczych z zastosowaniem technik biologii molekularnej. Zakres wykonanych badań świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktoranta warsztatu badawczego i o Jego ogromnej pracowitości.

Dobrze zaplanowane badania i zastosowane metody badawcze, w tym system do losowej mutagenyzy przy użyciu transpozonu EZ-Tn5, pozwoliły Doktorantowi wygenerować 350 mutantów szczepu dzikiego *C. jejuni* 81-176 i ocenić je pod kątem zdolności tworzenia biofilmu. Analizując bibliotekę transpozonową Autor dysertacji zidentyfikował geny związane z adhezją, metabolizmem, transportem błonowym i oddychaniem, których rola w tworzeniu biofilmu u *Campylobacter* nie była wcześniej badana. W kolejnych etapach badań Doktorant skoncentrował się na roli genu *cydB* (związany z łańcuchem oddechowym i metabolizmem) i *hydC* (związany z transportem elektronów i metabolizmem energetycznym) w tworzeniu biofilmu przez *C. jejuni*. Dla określenia roli genów *cydB* i *hydC* w produkcji biofilmu uzyskano mutanty delecyjne $\Delta cydB$ i $\Delta hydC$ *C. jejuni* oraz mutanty, w których dokonano komplementacji genów *cydB* i *hydC* do mutantów delecyjnych. Wykazano, że mutacje genów *cydB* i *hydC* nie wpłynęły na ruchliwość, wzrost ani żywotność bakterii, co mogłyby wpływać na tworzenie biofilmu. Natomiast delecja genów *cydB* i *hydC* znacząco obniżyła zdolność do produkcji biofilmu badanego szczepu *C. jejuni*. Mutant $\Delta cydB$ wytwarzał biofilm charakteryzujący się luźno zorganizowaną, nieregularną strukturą oraz znacznie mniejszą objętością niż szczep rodzicielski. Z kolei mutant $\Delta hydC$ produkował biofilm równomierny z przewagą komórek kokoidalnych, co świadczyło o przejściu komórek w stan obniżonej aktywności fizjologicznej i metabolicznej i zwiększeniu oporności na niekorzystne warunki środowiska (stan VBNC, ang. viable but not culturable). Komplementacja przywróciła fenotyp dziki w obu mutantach, przez co udowodniono, że obserwowany efekt związany jest wyłącznie z delecją tych genów. Wykorzystanie mikroprzepływowego systemu Bioflux umożliwiło Doktorantowi zbadanie dynamiki tworzenia biofilmu. W przypadku szczepu rodzicielskiego i szczepów komplementowanych *comp-cydB* i *comp-hydC* zaobserwowano systematyczny i stopniowy wzrost powierzchni zajmowanej przez biofilm. Przy czym w szczepie komplementowanym *comp-cydB* stwierdzono późniejsze uruchomienie produkcji biofilmu w stosunku do szczepu rodzicielskiego. Świadczy to o dostosowaniu tego szczepu do warunków środowiskowych i opóźnionej ekspresji genu *cydB* zlokalizowanego na plazmidzie. Wykazano natomiast, że tworzenie biofilmu przez mutanty $\Delta cydB$ i $\Delta hydC$ było bardzo ograniczone podczas całego eksperymentu. Biofilm mutantu $\Delta cydB$ zajmował jedynie 2-4% powierzchni kanału

mikroprzepływowego. Natomiast w przypadku mutantu *ΔhydC* w pierwszych godzinach eksperymentu biofilm stanowił 3-7%, a następnie 10-13% powierzchni kanału. Wyniki te sugerują, iż geny *cydB* oraz *hydC* wpływają pośrednio lub bezpośrednio na produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej. Te bardzo interesujące wyniki badań dotyczące tworzenia biofilmu przez szczep dziki i mutanty *C. jejuni* i oceną jego struktury wraz z wizualizacją za pomocą konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej oraz ocena dynamiki tworzenia w kanale układu mikroprzepływowego i wpływu delecji genów *cydB* i *hydC* na ruchliwość oraz wzrost na podłożu Mueller-Hintona wraz z krzywymi wzrostu przedstawiają bardzo czytelne ryciny 8-14. Zatem tekst rozdziału „**Wyniki**” uzupełniony wysokiej jakości rycinami przybliży czytającemu wyniki tych bardzo złożonych eksperymentów w sposób przejrzysty i komunikatywny.

Kolejna część dysertacji zawiera wnikliwą analizę uzyskanych wyników, popartą licznymi danymi z piśmiennictwa. W mojej opinii jest to autentyczna dyskusja, z której wynika zasadność prowadzenia kolejnych etapów badań dla uzyskania założonego celu. Podkreślam to, gdyż nie często zdarza się by autor dysertacji tak szczegółowo omawiał problematykę, której ona dotyczy. Redakcja tego rozdziału stanowi dowód dużej dojrzałości naukowej Doktoranta, której wyrazem jest umiejętność analizy uzyskanych wyników badań własnych w konfrontacji z danymi zawartymi w piśmiennictwie, a przede wszystkim dogłębną znajomością literatury przedmiotu.

Na zakończenie Doktorant formułuje cztery wnioski, które są poprawne i odpowiadają założonym celom badań oraz znajdują pełne odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach.

Recenzowaną pracę doktorską oceniam pozytywnie ze względu na jej następujące walory:

- stanowi ona szczegółowe opracowanie naukowe wnoszące nowe dane do patogenezy zakażeń pałeczkami *Campylobacter jejuni*, zwłaszcza dotyczące roli genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu;

- badania zrealizowano z zastosowaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej, co podnosi ich wartość naukową i wiarygodność uzyskanych wyników;

- wnioski z pracy pogłębiają aktualną wiedzę dotyczącą mechanizmu tworzenia biofilmu przez *Campylobacter jejuni* oraz dowodzą, iż system EZ-Tn5 jest skutecznym narzędziem do identyfikacji genów potencjalnie biorących udział w tworzeniu biofilmu tej bakterii;

- przenosząc uzyskane wyniki badań na grunt praktyczny należy stwierdzić, iż w ogóle lepsze poznanie procesu tworzenia biofilmu przez bakterie z rodzaju *Campylobacter* otwiera

na przyszłość możliwości opracowania inhibitorów ograniczających lub uniemożliwiających jego produkcję, co bez wątpienia przyczyni się do ograniczenia rozprzestrzeniania się zakażeń tymi bakteriami ludzi i zwierząt oraz ich przetrwania w środowisku produkcji żywności.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań stwierdzam, że Doktorant wykazał rolę genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu, co bez wątpienia uzupełnia wiedzę na temat molekularnych podstaw tego procesu u *Campylobacter jejuni*. W mojej opinii rozprawa doktorska mgr. Jakuba Korkusa stanowi potrzebne i wartościowe opracowanie dotyczące interesującego i aktualnego problemu badawczego.

Z obowiązku wnikliwego recenzenta pragnę Doktorantowi zwrócić uwagę na kilka, wcześniej nie wymienionych, niedociągnięć dotyczących głównie piśmiennictwa:

- praca Hakeem i Lu, 2021 (str 15) - w wykazie piśmiennictwa jest 2020 (powinno być 2021); w kilku cytowanych publikacjach w tekście podano błędny rok: Islam i wsp. 2005 (str. 17) - powinno być 2006, Crushell i wsp. 2003 (str 22) - powinno być 2004, Bridier i wsp. 2014 (str 72) - powinno być 2015, Beebout i wsp. 2018 (str 74) - powinno być 2021;

- brak w wykazie piśmiennictwa cytowanej w manuskrypcie na stronie 23 pracy Chandrashekar i wsp. 2015 oraz na stronie 72 pracy Rossi i wsp. 2021.

Ponadto na stronie 39 Doktorant pisze, cyt. „...próby wirowano...” powinno być „...próbki wirowano ..”; na stronie 66 jest, cyt. „Komórki żywe barwiono się na kolor zielony, ...” powinno być „...barwiły się ...”; na stronie 71 Ryc 14 jest, cyt. „Krzywe wzrostu typu dzikiego ...” powinno być „Krzywe wzrostu szczepu typu dzikiego ...” i wreszcie na stronie 77 Wniosek 1 jest, cyt. „... istotnie obniżyła poziom biofilmu w szczepie...” powinno być „...istotnie obniżyła poziom tworzenia biofilmu w szczepie...”.

Przedstawione uwagi krytyczne, które mają wyłącznie charakter porządkowy lub uzupełniający, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy i nadal nie wpływają na jej jednoznacznie bardzo pozytywną i wysoką ocenę.

W konkluzji wyrażam opinię, że rozprawa doktorska mgr. Jakuba Korkusa pt. „Rola genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu *Campylobacter jejuni*” spełnia ustawowe wymogi zawarte w art. 187 ust. 1 - 4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 742) oraz „Trybie postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora” wprowadzonego uchwałą nr 31/2023 Senatu Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 26 maja 2023 r. w sprawie wprowadzenia trybu postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora. Biorąc powyższe pod uwagę przedkładałam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr. Jakuba Korkusa do dalszych

etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora. Jednocześnie, z uwagi na walory naukowe i poznawcze, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



prof. dr hab. Andrzej Koncicki