

prof. UPP dr hab. inż. Wojciech Białas
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

Poznań, 21.02.2022r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Aleksandry Rajnisz-Mateusiak**
pt. „CHARAKTERYSTYKA PRZECIWBAKTERYJNYCH WŁAŚCIWOŚCI WTÓRNEGO
METABOLITU WYTWARZANEGO PRZEZ WYBRANY SZCZEP, REPREZENTUJĄCY
NOWOOPISANY GATUNEK PROMIENIOWCA Z RODZAJU *STREPTOMYCES* ”

wykonanej w
NARODOWYM INSTYTUTUCIE ZDROWIA PUBLICZNEGO PZH
- PAŃSTWOWYM INSTYTUTUCIE BADAWCZYM

pod kierunkiem
dr hab. Jolanty Soleckiej, prof. NIZP PZH – PIB

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest pismo prof. dr hab. Elżbiety A. Trafny – Przewodniczącej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – Państwowego Instytutu Badawczego z dnia 20.12.2021r., w którym poinformowała mnie, że decyzją Rady Naukowej NIZP PZH – PIB zostałem powołany na recenzenta ww. pracy.

Dobór i znaczenie tematu

Antybiotyki radykalnie zmieniły nasz świat, umożliwiając leczenie wcześniej nieuleczalnych chorób i umożliwiając bezpieczne wykonywanie różnego rodzaju procedur medycznych. Dzięki antybiotykowi uratowano miliony istnień ludzkich, poprawiło się także nasze samopoczucie i znacznie wzrosła długość życia. Ten niezwykły postęp jest jednak zagrożony przez narastającą w ostatnim czasie oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe. Wspomniana oporność jest głównym zagrożeniem dla zdrowia publicznego na świecie i sytuacja

ta wymaga natychmiastowej reakcji. Szacuje się, że do 2050 r. bez podjęcia pilnych działań liczba zgonów z powodu infekcji powodowanych przez wielolekooporne patogeny przekroczy 10 milionów rocznie. Wśród środków przeciwdrobnoustrojowych poważnym problemem jest oczywiście oporność bakterii na antybiotyki. Badania epidemiologiczne jednoznacznie potwierdziły bezpośredni związek między spożywaniem antybiotyków, a pojawieniem się i rozprzestrzenianiem się opornych szczepów bakterii. Pomimo licznych w ostatnim czasie ostrzeżeń dotyczących nadużywania antybiotyków, są one powszechnie przepisywane pacjentom na całym świecie. O skali problemu świadczą wyniki kompleksowej oceny spożycia antybiotyków, która wykazała, że w latach 2000-2015 nastąpił blisko 65% wzrost światowego spożycia tych środków leczniczych. Aby przeciwdziałać wzrostowi oporności na antybiotyki, WHO opracowała „Globalny Plan Działań” mający na celu ograniczenie oporności przeciwdrobnoustrojowej. Odpowiedzialne stosowanie antybiotyków uznano za jeden z pięciu kluczowych obszarów priorytetowych wspomnianego planu. Działania podjęte przez WHO skupiają się na wprowadzaniu środków regulacyjnych mających na celu ograniczenie i optymalizację przepisywania i wydawania środków przeciwdrobnoustrojowych oraz prowadzeniu kampanii ukierunkowanych na poprawę ogólnej świadomości i zrozumienia oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, zarówno wśród pracowników służby zdrowia, jak i ogółu społeczeństwa. Oprócz rosnącego zaniepokojenia lekoopornością, bardzo niepokojące jest także powolne tempo odkrywania i opracowywania nowych antybiotyków. Dostrzegając ten problem WHO powołało do życia Globalne partnerstwo na rzecz badań i rozwoju antybiotyków (GARDP). GARDP, będący inicjatywą non-profit, mobilizuje partnerów do opracowywania nowych i ulepszonych antybiotyków. We współpracy z rządami, sektorem prywatnym, środowiskiem akademickim i społeczeństwem obywatelskim opracowuje innowacyjne rozwiązania mające zasadnicze znaczenie dla realizacji Globalnego Planu Działania w sprawie Oporności Przeciwdrobnoustrojowej.

Mając na uwadze przedstawione wyżej fakty za celowe należy uznać badania naukowe stanowiące przedmiot recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Rajnisz-Mateusiak. Badania ukierunkowane na poszukiwanie oraz dogłębną charakterystykę nowych gatunków promieniowców z rodzaju *Streptomyces* produkujących metabolity wtórne o aktywności przeciwdrobnoustrojowej są bardzo aktualne i mają szeroko zakrojony wymiar poznawczy oraz aplikacyjny.

Ocena strony formalnej pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi bardzo obszerny materiał, liczący aż

161 stron maszynopisu. W pracy zamieszczono 29 tabel oraz 14 rycin, na które składają się liczne wykresy, rysunki oraz zdjęcia stanowiące opracowanie własne dokumentujące wykonane badania. Struktura rozprawy jest typowa dla prac o charakterze doświadczalnym. Rozprawa jest podzielona na 11 rozdziałów, w których przedstawiono przegląd literatury w formie wstępu do rozprawy, cel pracy, materiały, metody, wyniki badań wraz z ich podsumowaniem, dyskusję, wnioski, wykaz cytowanych publikacji oraz spis rycin i tabel. Załączono także obszerny wykaz skrótów stosowanych w pracy, ułatwiających czytelnikowi lekturę dysertacji. W treści opracowania nie zamieszczono jedynie streszczenia w języku polskim i angielskim, co oczywiście w żaden sposób nie umniejsza wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy. W pracy zacytowano 247 pozycji literaturowych. Większość pozycji pochodzi z ostatniej dekady i są one właściwie dobrane pod względem merytorycznym.

Tytuł rozprawy doktorskiej doskonale odzwierciedla jej treść. Obszerny wstęp do pracy jest bezpośrednio powiązany z celem badań. Omówienie wyników badań wraz z podsumowaniem jest bardzo szczegółowe, podczas gdy dyskusję można określić jako rzeczową i dojrzałą. Pod względem redakcyjnym oraz graficznym praca jest przygotowana poprawnie i bardzo starannie.

W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia wymagania formalne stawiane pracom dysertacyjnym na stopień naukowy doktora, ma bowiem charakter eksperymentalny i zawiera wszystkie niezbędne rozdziały, które uszeregowano w sposób typowy dla prac o charakterze doświadczalnym.

Ocena merytoryczna pracy

Recenzowana praca autorstwa Pani mgr Aleksandry Rajnisz-Mateusiak dotyczy odkrycia nowego gatunku promieniowca wytwarzającego metabolity wtórne o najprawdopodobniej nieopisaną strukturę chemiczną, które hamują wzrost bakterii Gram-ujemnych takich jak: *Klebsiella pneumoniae* oraz *Escherichia coli* i w przyszłości mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w medycynie. Pracę rozpoczyna 24-stronicowy wstęp literaturowy, który wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy. Wstęp składa się z czterech podrozdziałów. W pierwszej części Autorka szczegółowo przedstawiła problem antybiotykooporności, zwracając uwagę na przyczyny wstępowania tego zjawiska. Słusznie w mojej opinii podkreśliła, że zasadniczą przyczyną wzrostu antybiotykooporności szczepów bakteryjnych jest nadmierne lub niewłaściwe stosowanie antybiotyków nie tylko w medycynie, ale także w weterynarii. Autorka opisała także pokrótce mechanizmy lekooporności występujące u bakterii rodzaju *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, zwracając szczególną uwagę na obecność β -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania oraz systemów pomp efflux

odpowiedzialnych za usuwanie antybiotyków z komórek bakterii. Doktorantka przedstawiła także informacje dotyczące aktualnie prowadzonych badań klinicznych oraz nowych antybiotyków o aktywności wobec wielolekoopornych bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich zaaprobowanych przez agencje FDA i EMA. Ze względu na tematykę badań ten fragment pracy uważam za bardzo wartościowy. Podkreśla on wagę problemu i jednoznacznie wskazuje, że podjęte badania są jak najbardziej aktualne.

W drugiej części wstępu doktorantka przedstawiła ogólną charakterystykę promieniowców oraz bakterii z rodzaju *Streptomyces*, skupiając się na poszczególnych etapach charakterystyki taksonomicznej, która w rezultacie pozwala na dokładne i wiarygodne określenie rodzaju oraz ustalenie, czy badany szczep jest nowym gatunkiem. W trakcie lektury tej części pracy nasunęła mi się jedynie jedna wątpliwość związana z nomenklaturą odnoszącą się do sekwencji 16S rRNA. W pracy pojawia się termin „sekwencje konserwowane”. Mimo, iż w literaturze polskojęzycznej można znaleźć to określenie, to bardziej poprawną formą wydaje się termin „sekwencje konserwatywne”. Sens merytoryczny jest ten sam, a różnice są zapewne konsekwencją tłumaczenia tego terminu z literatury anglojęzycznej.

W dalszej części wstępu Autorka przedstawiła metabolizm wtórny bakterii z rodzaju *Streptomyces* podkreślając przy tym, że mikroorganizmy te są głównymi producentami bioaktywnych metabolitów wtórnych, wykazujących m.in. działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, immunosupresyjne, chwastobójcze. W ostatniej części wstępu autorka przedstawiła tradycyjne, jak i nowoczesne strategie poszukiwania nowych związków pochodzenia mikrobiologicznego o aktywności przeciwbakteryjnej. Dyskusyjne jest jedynie stwierdzenie, podparte co prawda danymi literaturowymi, zgodne z którym nowoczesne techniki analizy genomu promieniowców, umożliwiają prowadzenie ukierunkowanych poszukiwań bioaktywnych metabolitów bez konieczności hodowli drobnoustrojów. Zgadzam się, że analiza z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych może wskazać sekwencje w genomie umożliwiające potencjalną biosyntezę określonego metabolitu, ale praktyka wskazuje, że od sekwencji do wydajnej biosyntezy jest jeszcze daleka droga. Poza tym metody te bazują na obliczeniach, które są obarczone pewnym błędem i pozytywny wynik wymaga oczywiście weryfikacji eksperymentalnej.

Podsumowując uważam, że treści zawarte we wstępie do rozprawy doktorskiej wskazują na doskonałe przygotowanie merytoryczne Pani Aleksandry Rajnisz-Mateusiak do realizacji badań. Ta część pracy ma przemyślaną strukturę i stanowi doskonałą podbudowę teoretyczną do omówienia wyników analiz zaprezentowanych w dalszej części rozprawy.

Szczegółowy opis zastosowanych materiałów oraz metod badawczych i analitycznych

został zawarty w rozdziałach „Materiały” oraz „Metody”. Autorka podzieliła wspomniane rozdziały na siedem (materiały) i trzynaście (metody) podrozdziałów, w których bardzo precyzyjnie opisała techniki stosowane na kolejnych etapach realizacji swojej pracy doktorskiej. W mojej opinii dobór metod oraz sposób ich wykorzystania jest prawidłowy. Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykorzystania obok tradycyjnych metod stosowanych w mikrobiologii także zaawansowanych narzędzi biologii molekularnej, bioinformatyki oraz nowoczesnych metod analitycznych, takich jak chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas. Pozwoliło to Autorce wykonać między innymi wielokierunkową analizę taksonomiczną obejmującą również charakterystykę fenotypową i badanie markerów strukturalnych osłon komórkowych bakterii tzw. chemiotaksonomię, dzięki czemu udowodniła, że badania prowadziła na nowym gatunku promieniowca posiadającym zdolność do biosyntezy metabolitów wtórnych wykazujących aktywność przeciwbakteryjną. Do tej części pracy mam dwie drobne uwagi odnoszące się do opisów metod zawartych w podrozdziałach 4.11.4. (Oznaczanie aktywności przeciwbakteryjnej supernatantów w stosunku do referencyjnych szczepów bakterii oraz szczepów klinicznych) oraz 4.11.5. (Porównanie właściwości przeciwbakteryjnych metabolitów wtórnych wytwarzanych przez wybrany nowy gatunek do aktywności znanych antybiotyków pochodzenia mikrobiologicznego). W pierwszym przypadku zaznaczono, że do badań wybrano dwie hodowle charakteryzujące się najniższym oraz najwyższym przyrostem biomasy, bez uzasadnienia dlaczego podjęto taką decyzję. W drugim przypadku w odniesieniu do badań porównawczych napisano jedynie, że w oparciu o doniesienia badawcze porównano właściwości przeciwbakteryjne znanych antybiotyków pochodzenia mikrobiologicznego z aktywnością metabolitów wtórnych wytwarzanych przez wybrany nowy gatunek promieniowca, nie wymieniając, jakie antybiotyki zastosowano podczas badań. Co prawda brakujące informacje pojawiają się w treści pracy na etapie omówienia wyników badań, jednakże wydaje mi się, że kilka słów wyjaśnienia powinno być zawarte także w rozdziale metody.

Poprawne zaplanowanie badań i konsekwentna ich realizacja przez doktorantkę dostarczyła wielu bardzo ciekawych i oryginalnych wyników, istotnych nie tylko pod względem poznawczym, ale także aplikacyjnym. Punktem wyjścia podjętych badań był wybór izolatów bakterii, które miały być źródłem metabolitów wtórnych hamujących wzrost wybranych szczepów bakterii patogennych takich jak *Escherichia coli* czy *Staphylococcus aureus*. Na podstawie analizy aktywności przeciwbakteryjnej oraz analizy porównawczej pełnogenomowych sekwencji do badań wytypowano cztery nowe gatunki opisane w pracy jako: *Streptomyces* sp. PL1, *Kitasatospora* sp. PL4 oraz *Streptomyces* sp. SO3 i *Streptomyces* sp. RM1. Przy czym do szczegółowej analizy taksonomicznej wytypowano, kierując się największą wartością strefy

zahamowania wzrostu bakterii *Escherichia coli* ATCC® BAA-198, nowy gatunek opisany jako *Streptomyces* sp. PL1. Autorka przedstawiła szczegółową charakterystykę supernatantów z hodowli tego gatunku w odniesieniu do wybranych szczepów wskaźnikowych pozyskanych z kolekcji mikroorganizmów. Bardzo oryginalny charakter miały też badania doktorantki, których przedmiotem była ocena aktywności przeciwbakteryjnej metabolitów wtórnych w supernatancie wobec klinicznych szczepów *Escherichia coli* wytwarzających ESBL. Zebrane dane są bardzo cenne, ponieważ jak wskazują liczne doniesienia literaturowe w wielu przypadkach badania wykonane wobec szczepów wskaźnikowych nie znajdują potwierdzenia w odniesieniu do szczepów klinicznych. Nie do końca zasadnym jest natomiast porównywanie wartości MIC zawartych w Tab. 25 wyznaczonych dla szczepów klinicznych *Escherichia coli* z wartościami MIC dla antybiotyków: penicyliny oraz polimyksyny B, które oznaczono w odniesieniu do szczepów referencyjnych *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 i *Escherichia coli* ATCC 25922. Szkoda, że w tym miejscu nie zawarto danych, które pozwoliłyby porównać skuteczność wspomnianych antybiotyków w odniesieniu do badanych szczepów klinicznych.

Chciałbym zauważyć, że bardzo ciekawym elementem pracy były także badania mające na celu optymalizację biosyntezy metabolitów wtórnych przez *Streptomyces* sp. PL1 poprzez określenie wpływu źródła węgla w podłożu produkcyjnym na aktywność przeciwbakteryjną supernatantu z hodowli, zbadanie dynamiki wzrostu i wytwarzania bioaktywnych metabolitów wtórnych. Ustalona optymalna temperatura do wzrostu *Streptomyces* sp. PL1 wynosiła od 20°C do 37°C, natomiast optymalne wartości pH podłoża to zakres od 6 do 8. Wzrost grzybni szczepu obserwowano w podłożu z dodatkiem NaCl o stężeniu do 4%. Wykazano ponadto, że szczep wykorzystywał do wzrostu jako źródło węgla D-glukozę, D-laktozę, D-fruktozę, D-mannozę, glicerol albo rafinozę. Zebrane dane stanowią tym samym swego rodzaju zestaw wytycznych do rozpoczęcia badań nad powiększaniem skali procesu biosyntezy w bioreaktorach.

W dalszej części pracy Autorka opisuje wyniki badań związanych z badaniem pełnogenomowej sekwencji szczepów nowych gatunków w kierunku obecności klastrów genów biosyntezy opisanych metabolitów wtórnych. Do analizy wykorzystano pełnogenomowe sekwencje szczepów *Streptomyces* sp. PL1, *Streptomyces* sp. SO3, *Kitasatospora* sp. PL4 oraz *Streptomyces* sp. RM1, którego genom został zsekwencjonowany z użyciem platformy Illumina. Na podstawie analizy wykazano, że geny odpowiedzialne za biosyntezę bioaktywnych metabolitów wtórnych *Streptomyces* sp. PL1 są zlokalizowane na 654 713 pz, co stanowi 9% wielkości całego genomu. Interesujące jest także to, iż 19 klastrów genów biosyntezy metabolitów wtórnych nie wykazywało podobieństwa do znanych substancji pochodzenia

mikrobiologicznego, co w pewnym stopniu wskazuje, że badany szczep może być także źródłem zupełnie nowych substancji o dotychczas niepoznanych właściwościach i strukturze. W odniesieniu do liczby klastrow dla *Streptomyces* sp. PL1 pojawia się w pracy pewna nieścisłość wymagająca wyjaśnienia. Mianowicie na stronie 106 jest mowa o 19 klastrach, podczas gdy na stronie 134 pojawia się informacja o 28 klastrach. Wydaje mi się, że tutaj zastosowano pewien skrót myślowy, który wprowadza czytelnika w błąd.

W ostatniej części pracy doktorantka za pomocą zaawansowanych technik instrumentalnych wykazała, że badane supernatanty nie zawierają znanych metabolitów wtórnych o aktywności przeciwbakteryjnej, takich jak antybiotyki z grupy aminoglikozydów, czy tetracyklin. W badanym supernatancie nie stwierdzono bowiem obecności streptomycyny, kanamycyny, spektynomycyny, neomycyny oraz oksytetracykliny, tetracykliny i chlorotetracykliny.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” doktorantka przeprowadziła szczegółową dyskusję zaprezentowanych danych eksperymentalnych, trafnie nawiązując do badań innych naukowców zajmujących się podobną tematyką. Sposób dyskusji wskazuje na dojrzałość naukową doktorantki oraz bardzo dobrą znajomość literatury naukowej dotyczącej zagadnień stanowiących przedmiot rozprawy. Bardzo ciekawym elementem dyskusji są rozważania mające na celu analizę porównawczą spektrum aktywności badanych supernatantów z hodowli *Streptomyces* sp. PL1 w odniesieniu do wybranych bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich oraz ich porównanie z aktywnościami gatunków najbliższej spokrewnionych. Na stronach 130-134 rozprawy doktorantka dokonała pogłębionej analizy wspomnianych danych trafnie nawiązując do wyników analiz wykonanych metodami bioinformatycznymi. Na ich podstawie wykluczyła z puli metabolitów wtórnych spektynomycyny oraz bicyklomycyny. Ostatnim elementem rozprawy są wnioski, które stanowią kompleksowe podsumowanie uzyskanych wyników. Sposób sformułowania wniosków jest poprawny, ich treść nawiązuje do celu pracy.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa zawiera wiele elementów nowości naukowej, które wyraźnie rozszerzają wiedzę na temat nieopisanych do tej pory metabolitów wtórnych o aktywności przeciwbakteryjnej syntetyzowanych przez nowe gatunki promieniowców izolowanych z gleby pochodzącej z terenów o wysokiej bioróżnorodności fauny i flory. Oprócz istotnych walorów poznawczych rozprawa doktorska mgr Aleksandry Rajnisz-Mateusiak ma wyraźne praktyczne ukierunkowanie, co stanowi jej niezaprzeczalny atut. Treść rozprawy pokazuje też wyraźnie, jak trudnym zadaniem jest poszukiwanie producentów nowych metabolitów wtórnych oraz ich kompleksowa charakterystyka.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Rajnisz-Mateusiak pt. „CHARAKTERYSTYKA PRZECIWBAKTERYJNYCH WŁAŚCIWOŚCI WTÓRNEGO METABOLITU WYTWARZANEGO PRZEZ WYBRANY SZCZEP, REPREZENTUJĄCY NOWOOPISANY GATUNEK PROMIENIOWCA Z RODZAJU *STREPTOMYCES*” spełnia warunki określone w art. 13. Ust. 1 z dnia 14 marca 2013 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (*Dz. U z 2017, poz.1789*). W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – Państwowego Instytutu Badawczego o przyjęcie tej pracy i dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Rajnisz-Mateusiak do dalszych etapów postępowania związanego z ubieganiem się o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauki medyczne, dyscyplina biologia medyczna.

Aleksandra Rajnisz-Mateusiak