Załącznik nr 2
do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr n. biol. Marta Ewa Dec

Zakład Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

LUBLIN, 2018

1. Imię i Nazwisko

Marta Ewa Dec

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2010 Stopień naukowy: **doktor nauk biologicznych w zakresie biologii**, nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w dniu 22 września 2010 roku; tytuł rozprawy doktorskiej: *„Konglutynina – ocena wybranych właściwości biochemicznych i biologicznych”* (promotor: prof. dr hab. Andrzej Wernicki)

2003 Tytuł: **magister**; dyplom ukończenia 2-letnich studiów magisterskich na kierunku **biologia w zakresie mikrobiologii** z dnia 13 czerwca 2003 roku, wydany przez Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; tytuł rozprawy magisterskiej: *„Wpływ betuliny i kwasu betulinowego na wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach linii HepG2 po indukcji etanolem i aldehydem octowym”* (promotor: prof. dr hab. Martyna Kandefer-Szerszeń)

2001 Tytuł: **licencjat**; dyplom ukończenia 3-letnich studiów na kierunku **biologia w zakresie mikrobiologii** z dnia 14 września 2001 roku, wydany przez Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; tytuł pracy licencjackiej: *„Cytokiny prozapalne”* (promotor: prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

01.10.2010 - do chwili obecnej	*Adiunkt* w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
01.10.2006 – 30.09.2010	*Asystent* w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie (do 2008 r. Akademia Rolnicza)
12.11.2003 – 30.09.2006	*Starszy technik* w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie

4. Wskazane osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311):

a) tytuł osiągnięcia artystycznego/naukowego

Osiągnięciem naukowym jest tematyczny cykl publikacji objęty tytułem:

Doskonalenie metod identyfikacji oraz ocena właściwości probiotycznych i antybiotykowrażliwości bakterii z rodzaju Lactobacillus izolowanych od drobiu

b) publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

1. **Dec M.**, Urban-Chmiel R., Gnat S., Puchalski A., Wernicki A., 2014: **Identification of *Lactobacillus* strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis.** *Research in Microbiology* 165: 190-201.

   IF(2014): **2,705**, punktacja MNiSW(2014): **25**

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wyizolowaniu pałeczek Lactobacillus i stworzeniu kolekcji czystych kultur, opracowaniu protokołu izolacji DNA z lactobacilli i protokołów genotypowania, wykonaniu testów genetycznych, analizie i interpretacji wyników badań, zredagowaniu zdjęć zamieszczonych w pracy, napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 80%.

2. **Dec M.**, Puchalski A., Urban-Chmiel R., Wernicki A., 2014: **Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics.** *Poultry Science* 93: 2464-2472.

   IF(2014): **1,672**, punktacja MNiSW(2014): **40**

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu większości testów laboratoryjnych, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%.

3. **Dec M.**, Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R., 2015: **Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* strains isolated from domestic geese.** *British Poultry Science* 56: 416-424.

   IF(2015): **0,933**, punktacja MNiSW(2016): **30**

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu protokołu oznaczaniu lekowrażliwości izolatów Lactobacillus i wykonaniu badania, analizie i interpretacji wyników oraz napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%.

4. **Dec M.**, Puchalski A., Urban-Chmiel R., Wernicki A., 2016: **16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry.** *BMC Microbiology* J16: 105.
IF(2016): **2,644**, punktacja MNiSW(2016): **30**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu analiz in silico i opracowaniu protokołów identyfikacji lactobacilli, amplifikacji 16S rDNA i trawieniu amplikonów enzymami restrykcyjnymi, wykonaniu rozdziałów elektroforetycznych, analizie i interpretacji wyników badań, zredagowaniu zdjęć zamieszczonych w pracy, napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%.

5. **Dec M.**, Puchalski A., Nowaczek A., Wernicki A., 2016: **Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains of chicken origin against bacterial pathogenss.** *International Microbiology* 19: 57-67.
IF(2016): **1,057**, punktacja MNiSW(2016): **25**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu kolekcji izolatów Lactobacillus, opracowaniu koncepcji badań, identyfikacji lactobacilli, wykonaniu większości oznaczeń laboratoryjnych i analizy statystycznej, interpretacji wyników badań i napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%.

6. **Dec M.**, Urban-Chmiel R., Stępień-Pyśniak D., Wernicki A., 2017: **Assessment of antibiotic susceptibility in *Lactobacillus* isolates from chickens.** *Gut Pathogens* 9: 54.
IF(2017): **2,809**, punktacja MNiSW(2016): **25**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, oznaczeniu fenotypowej wrażliwości izolatów na szereg substancji przeciwdrobnoustrojowych, detekcji genów oporności, analizie i interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%.

7. **Dec M.**, Nowaczek A., Urban-Chmiel R., Stępień-Pyśniak D., Wernicki A., 2018: **Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates of chicken origin with anti-*Campylobacter* activity.** *Journal of Veterinary Medical Science* 80: 1195-1203.
IF(2017): **0,803**, punktacja MNiSW(2016): **20**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zebraniu i identyfikacji izolatów Lactobacillus, oznaczeniu ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej i tolerancji na niskie pH i sole żółci, wykonaniu analizy statystycznej, interpretacji wyników badań i napisaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 85%.

Łączna punktacja prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji:

- według list Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: **195 pkt**
- łączny Impact Factor (IF) według bazy Journal Citation Reports (JCR): **12,623**

Artykuły stanowiące osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy, znajdują się w załączeniu (Zał. 6).

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

I. Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* będące przedmiotem prezentowanych badań to gramdodatnie, aerotolerancyjne lub beztlenowe, katalazo-ujemne pałeczki o zawartości G+C 32-55 mol%. Są one najliczniejszą grupą w obrębie bakterii fermentacji mlekowej (LAB, ang. lactic acid bacteria), charakteryzujących się wytwarzaniem kwasu mlekowego jako końcowego produktu metabolizmu węglowodanów. Taksonomicznie lactobacilli należą do typu *Firmicutes,* klasy *Bacilli*, rzędu *Lactobacillales,* rodziny *Lactobacillaceae*. Aktualnie rodzaj *Lactobacillus* obejmuje 228 gatunków (baza NCBI, dane z sierpnia 2018), wśród których, na podstawie sekwencji genów kodujących 16S rRNA, wyodrębniono 29 grup filogenetycznych. Ze względu na duże wymagania wzrostowe lactobacilli występują w środowiskach bogatych w węglowodany, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, estry, puryny, pirymidyny i witaminy. Naturalnymi siedliskami tych bakterii są błony śluzowe ludzi i zwierząt, mleko i jego produkty oraz zdrowe i gnijące rośliny. Dzięki zdolnościom fermentacyjnym i konserującemu działaniu wytwarzanych metabolitów pałeczki *Lactobacillus* znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym do produkcji fermentowanych napojów mlecznych, serów, wędlin, kiszonek oraz pasz zwierzęcych (Zhang i Cai 2014).

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* odgrywają ogromną rolę w fizjologii gospodarza. Odpowiadają za utrzymanie równowagi mikrobiologicznej błon śluzowych, poprawiają trawienie i przyswajanie składników pokarmowych, usuwają substancje toksyczne i podnoszą odporność. Redukcja mikroflory niekorzystnej przy udziale lactobacilli zachodzi na drodze konkurencji o miejsce przylegania na nabłonku i o składniki pokarmowe oraz poprzez wytwarzanie substancji przeciwdrobnoustrojowych, takich jak kwasy organiczne, bakteriocyny, nadtlenek wodoru (H_2O_2) czy dwutlenek węgla (CO_2). Produkowany przez lactobacilli kwas mlekowy, a także octowy i propionowy, obniżają pH środowiska poza zakres optymalny do wzrostu wielu drobnoustrojów patogennych i zwiększają przepuszczalność błony zewnętrznej u bakterii gramujemnych (Lebeer 2008). Bakteriocyny wytwarzane przez niektóre szczepy *Lactobacillus* to substancje białkowe wykazujące działanie antybakteryjne, a ich aktywność uzależniona jest od obecności receptorów powierzchniowych na komórce docelowej. Mechanizm działania bakteriocyn najczęściej polega na tworzeniu porów w błonie komórkowej bakterii przez co dochodzi do wypływu ATP, aminokwasów i jonów oraz zaburzenia potencjału

błonowego komórki. Przeciwdrobnoustrojowe działanie nadtlenku wodoru jest spowodowane utlenianiem grup sulfhydrylowych, które prowadzi do denaturacji enzymów komórkowych. H_2O_2 zaburza także funkcjonowanie błony komórkowej na skutek peroksydacji lipidów błonowych i jest prekursorem w biosyntezie innych reaktywnych form tlenu (Śliżewska i wsp. 2006). Dwutlenek węgla będący jednym z produktów ubocznych heterofermentacji mlekowej przyczynia się do wytwarzania środowiska beztlenowego, w którym wiele mikroorganizmów nie posiada zdolności wzrostu. Jego bakteriobójcze działania związane jest także z zaburzaniem przepuszczalności błon komórkowych oraz hamowaniem procesów dekarboksylacji w komórkach (Ouwehand i Vesterlund 2004).

Ze względu na aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz inne mechanizmy działania prozdrowotnego pałeczki *Lactobacillus* wykorzystywane są do produkcji preparatów probiotycznych, żywności funkcjonalnej i dodatków paszowych. Według aktualnie obowiązującej definicji przedstawionej przez Organizację Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) oraz Światową Organizację Zdrowia (WHO) probiotykami określa się żywe organizmy, które podawane w odpowiednich ilościach wywierają pozytywne efekty zdrowotne na organizm gospodarza (FAO/WHO 2002). W weterynarii zainteresowanie mikrobiologicznymi dodatkami paszowymi znacznie wzrosło po wprowadzeniu w 2006 roku w krajach Unii Europejskiej zakazu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu w chowie zwierząt gospodarskich. Nowe regulacje podyktowane były przede wszystkim narastającą antybiotykoopornością bakterii oraz koniecznością pozyskiwania zdrowej żywności pozbawionej kontaminacji lekami przeciwdrobnoustrojowymi (Przeniosło-Siwczyńska i Kwiatek 2013). Zainteresowaniu probiotykami sprzyja także zwiększająca się w ostatnich latach świadomość na temat roli mikroflory jelitowej. Mikroorganizmy zasiedlające przewód pokarmowy tworzą złożony ekosystem, pozostający w symbiotycznych relacjach z makroorganizmem. Poprzez wpływ na fizjologię, metabolizm i odporność gospodarza, mikroflora jelitowa odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu gospodarza, a jej nieprawidłowy skład może być przyczyną różnych chorób (Radwan i Skrzydło-Radomańska 2013). Poznanie mikroflory korzystnej, której przedstawicielami są pałeczki *Lactobacillus*, właściwości i roli poszczególnych gatunków i szczepów jest zatem niezwykle istotne nie tylko ze względu na aspekt poznawczy ale także z punktu widzenia doskonalenie metod hodowli zwierząt.

Określenie bioróżnorodności mikroflory jelitowej wymaga ustalenia tożsamości taksonomicznej poszczególnych jej członków. W przypadki pałeczek *Lactobacillus* identyfikacja nie jest zadaniem prostym. Utrudnia ją duża, ciągle wzrastająca liczba

gatunków należących do tego rodzaju bakterii oraz ich różnorodność biochemiczna i genetyczna. Klasyfikacja lactobacilli oparta na charakterystyce fenotypowej jest czasochłonna i trudna, ponieważ wymaga zastosowania przynajmniej 17 testów biochemicznych (Tannock i wsp. 1999). Wyniki uzyskiwane na podstawie komercyjnych zestawów API CHL50 (Biomerieux) są często dwuznaczne lub nawet błędne (Song i wsp. 1999). Z tego względu przy identyfikacji lactobacilli wskazane jest stosowanie alternatywnych metod o wyższej rozdzielczości. Jedną z nich jest sekwencjonowanie 16S rDNA standardowo wykorzystywane w badaniach taksonomicznych bakterii. Metoda ta ma wysoką siłę dyskryminacji, ale możliwa jest do wykonania tylko w laboratoriach wyposażonych w sekwenator DNA. Ceny zakupu i utrzymania tego urządzenia przekraczają możliwości finansowe większości jednostek naukowo-badawczych, a sekwencjonowanie w laboratoriach usługowych jest nieopłacalne w przypadku analizy dużej liczby próbek. Istnieje zatem konieczność poszukiwania nowych, łatwych w wykonaniu i wydajnych metod identyfikacji pałeczek *Lactobacillus*.

Ustalenie prawidłowej tożsamości taksonomicznej jest także jednym z wymogów stawianych szczepom probiotycznym. Ponadto, probiotyki powinny wywodzić się z naturalnej mikroflory gatunku, dla którego są przeznaczone. Pozwala to uzyskać materiał biologiczny maksymalnie dostosowany do warunków panujących w przewodzie pokarmowym docelowego gospodarza. Probiotykami mogą być drobnoustroje niepatogenne, nietoksynogenne i niezawierające genów oporności nabytej. Według regulacji UE mikrobiologiczne dodatki paszowe muszą posiadać status bezpieczeństwa stosowania określany jako QPS (*Qualified Presumption of Safety*), którego odpowiednikiem w USA jest status GRAS (*Generally Recognised As Safe*) (EFSA 2012, Shewale i wsp. 2014). Wśród cech funkcjonalnych probiotyków podawanych *per os* istotna jest przeżywalność podczas pasażu przez żołądek i dwunastnicę, zdolność do kolonizacji miejsc docelowych oraz konkurencyjność wobec innych członków mikroflory jelitowej. Mechanizmy prozdrowotnego działania probiotyków są wielokierunkowe i jeszcze nie do końca poznane. Rozważa się ich oddziaływanie na środowisko panujące w świetle jelit, mechanizmy związane z kształtowaniem bariery nabłonkowej i wzmocnieniem jej integralności oraz wpływ na rozwój i aktywność układu immunologicznego błon śluzowych (Ng i wsp. 2009). Szczepy probiotyczne ulegają samopowieleniu w organizmie gospodarza, nie mają skutków ubocznych, a ich stosowanie nie wymaga okresu karencji. Poprzez redukcję mikroflory niekorzystnej i poprawę trawienia oraz przyswajania niektórych składników pokarmowych probiotyki przyczyniają się do szybszego przyrostu masy ciała zwierząt, lepszego wykorzystania paszy, a w efekcie do podwyższenia wskaźników

ekonomicznych odchowu i pozyskiwania bezpiecznej żywności (Lutful Kabir 2009, Park i wsp. 2016).

Pomimo stosowania zasad bioasekuracji i stopniowego wdrażania alternatywnych metod kontrolowania infekcji w stadach, nadal powszechną strategią utrzymywania zdrowotności zwierząt, w tym drobiu, jest aplikacja antybiotyków. Wieloletnie stosowanie leków tego typu w produkcji zwierzęcej, zarówno w celach terapeutycznych jak i profilaktycznych, przyczyniło się do narastania antybiotykooporności wśród bakterii. Szczególnie duże zagrożenie stanowią antybiotykooporne drobnoustroje chorobotwórcze, ale zjawisko lekooporności dotyczy także bakterii niepatogennych, takich jak lactobacilli. Pomimo ograniczonych informacji na temat lekowrażliwości pałeczek *Lactobacillus* pochodzących od zwierząt są ograniczone, istnieją doniesienia wskazujące na udział tych bakterii w transferze genów oporności. Wykazano, że możliwe jest przekazywanie genetycznych determinant warunkujących oporność pomiędzy różnymi gatunkami *Lactobacillus* oraz z lactobacilli do bakterii potencjalnie chorobotwórczych takich jak enterococci (Devirgiliis i wsp. 2013). Zachodzenie tego zjawiska może przyczyniać się do rozwoju oportunistycznych zakażeń u zwierząt i stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia publicznego.

II. Cel badań

Badania przedstawione w publikacjach stanowiących omawiane osiągnięcie naukowe zostały wykonane na reprezentatywnej puli izolatów *Lactobacillus* pozyskanych od drobiu (gęsi, kury) hodowanego na kilkudziesięciu fermach w Polsce. W literaturze światowej nie ma żadnych innych doniesień na temat lactobacilli od gęsi, a badania krajowe dotyczące pałeczek *Lactobacillus* od kur dotyczą jedynie wybiórczych aspektów z tego zakresu lub pojedynczych szczepów. Projekt ma charakter zarówno poznawczy jak i aplikacyjny, a jego główne cele to:

- opracowanie prostych, powtarzalnych i wiarygodnych metod identyfikacji gatunkowej pałeczek *Lactobacillus*,
- określenie zróżnicowania gatunkowego lactobacilli występujących u drobiu w Polsce,
- ocena probiotycznego potencjału lactobacilli ze szczególnym uwzględnieniem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej w stosunku do bakteryjnych patogenów drobiu i selekcja szczepów *Lactobacillus*, które mogłyby znaleźć zastosowanie jako dodatki paszowe poprawiające zdrowotność ptaków, a tym samym ekonomiczne wskaźniki odchowu drobiu,

- określenie fenotypowych i genotypowych profili antybiotykowrażliwości lactobacilli oraz ocena środowisk polskich ferm drobiowych w kontekście rezerwuaru antybiotykoopornych szczepów *Lactobacillus* i ich genów oporności.

III. Omówienie wyników

III.a) Izolacja i identyfikacja pałeczek *Lactobacillus* od drobiu (praca nr 1, 4, 5, 7)

W prezentowanych badaniach wykorzystałam łącznie 119 próbek świeżego kału lub wymazów z kloaki od gęsi, kur i indyków pochodzących z 33 ferm drobiowych zlokalizowanych na terenie województwa lubelskiego, wielkopolskiego i warmińsko-mazurskiego. Z każdej fermy pobierałam 3-5 próbek. Z zebranego materiału biologicznego wyizolowałam łącznie 233 izolatów *Lactobacillus*, w tym 104 izolaty od gęsi (gęś biała Kołudzka), 120 izolatów od kur (rasy mięsnej broiler i ogólnoużytkowej - zielononóżka kuropatwiana) i 9 izolatów od indyków (typ średniociężki).

Standardowa metoda izolacji pałeczek *Lactobacillus* opisywana w literaturze polega na posiewaniu próbek biologicznych na podłoże MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) i hodowli bakterii w warunkach beztlenowych. Ja natomiast zmodyfikowałam ten protokół i namnażałam izolaty *Lactobacillus* na pożywce MRS z dodatkiem 0,5% L-cysteiny w atmosferze zawierającej 5% CO_2. O wyborze tej metody hodowli zadecydowały wstępne badania, podczas których zaobserwowałam, że izolaty różnych gatunków *Lactobacillus* rosną tak samo dobrze w warunkach beztlenowych jak i w atmosferze 5% CO_2 oraz, że dodatek L-cysteiny do podłoża MRS wzmaga wzrost niektórych lactobacilli, głównie *L. johnsonii*. Zmiana warunków beztlenowych na hodowlę w atmosferze z dodatkiem 5% CO_2 pozwoliła także na znaczne obniżenie kosztów badań.

Z każdej próbki typowałam do dalszych badań wszystkie szczepy różniące się od siebie morfologią kolonii. Takie postępowanie pozwoliło ocenić zróżnicowanie gatunkowe lactobacilli w obrębie poszczególnych gatunków ptaków i stad oraz u pojedynczych osobników, a także umożliwiło dokonanie korelacji pomiędzy wiekiem ptaków a występowaniem lactobacilli. W pracy nr 1 wykazałam, że w przypadku większości (75%) próbek pochodzących od piskląt gęsi (1-10 dni) nie występowały lactobacilli, a na agarze MRS udało się wyizolować jedynie ziarniaki (*Enterococcus* sp.). Natomiast w przypadku ptaków starszych (gęsi, kury, indyki) z pojedynczej próbki biologicznej uzyskiwałam od 1 do 7 izolatów *Lactobacillus* różniących się morfologią kolonii i przynależnych do kilku różnych gatunków (praca nr 1 i 5).

Do identyfikacji pozyskanych izolatów *Lactobacillus* zastosowałam nowoczesne molekularne metody identyfikacji tj. spektrometria masowa (SM) typu MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) oraz analiza rybosomalnego DNA (16S rDNA oraz 16S-23S rDNA). Dzięki opracowaniu protokołów ww. metod

wykazałam, że u drobiu w Polsce występuje 15 gatunków *Lactobacillus*, a do najczęściej izolowanych należą szczepy *L. salivarius* (34-35.6%), *L. johnsonii* (18,3-23%), *L. crispatus* (3,8-13%) i *L. ingluviei* (9-11,5%), *L. reuteri* (4,8-11%) i *L. crispatus* (3,8-13%). Pozostałe gatunki, tj. *L. agilis, L. oris, L. mucosae, L. saerimneri, L. plantarum, L. paracasei, L. rhamnosus, L. amylovorus, L. kitasatonis* i *L. farciminis* identyfikowałam sporadycznie (0-7,7%). Większą różnorodność gatunkową odnotowałam w przypadku gęsi (14 gatunków *Lactobacillus*), niż u kur (10 gatunków). Zaobserwowałam także znaczne różnice w częstotliwości występowania niektórych gatunków *Lactobacillus* pomiędzy tymi dwoma gatunkami ptaków. Przykładowo odsetek pałeczek *L. crispatus* w puli izolatów od kur stanowił 13%, a w przypadku gęsi zaledwie 3,8%. Do najczęściej opisywanych przez innych autorów gatunków *Lactobacillus* występujących u kurcząt należą *L. crispatus, L. reuteri* i *L. salivarius* (Abbas Hilmi i wsp. 2007, Stephenson i wsp. 2010). Rzadziej natomiast wymieniane są gatunki *L. johnsonii* (Vidanarachchi i wsp. 2007) czy *L. ingluviei* (Nazef i wsp. 2008), które izolowałam z dużą lub umiarkowaną częstotliwością od drobiu w Polsce.

Identyfikacja pałeczek Lactobacillus za pomocą spektrometrii masowej typu MALDI-TOF

Spektrometria masowa (SM) typu MALDI-TOF jest nowoczesną metodą umożliwiającą szybkie różnicowanie bakterii na poziomie gatunku lub nawet podgatunku. Stanowi ona alternatywę dla bardziej czasochłonnych i często droższych metod opartych na analizie materiału genetycznego drobnoustroju, które wymagają wykonania ekstrakcji DNA, amplifikacji i sekwencjonowania lub rozdziału elektroforetycznego. Metoda spektrometrii masowej oparta jest na analizie unikatowego, niepowtarzalnego dla każdego gatunku drobnoustroju, profilu białek komórkowych, określanego jako molekularny odcisk palca. Identyfikacja opiera się na porównaniu widma masowego badanego izolatu (analiza rozmieszczenia, ilości i intensywności pików) z widmami szczepów referencyjnych zamieszczonych w bazie danych (Singhal i wsp. 2015).

Podczas realizacji prezentowanych badań korzystałam ze spektrometru masowego UltrafleXtreme firmy Bruker (Germany) oraz z oprogramowania MALDI Biotyper 3.0 (Bruker, Germany) zawierającego ponad 218 referencyjnych widm masowych różnych gatunków *Lactobacillus*. Wyniki identyfikacji uzyskiwane za pomocą programu Biotyper 3.0 są przedstawiane w postaci 10 najlepszych dopasowań (widma badanego do widm wzorcowych), z których każdemu przypisana jest odpowiednia wartość log(score). Zgodnie z rekomendacjami producenta (Bruker)

wyniki o wartości log(score) 2.300-3000 oznaczają wysoce prawdopodobną identyfikację do poziomu gatunku, te z przedziału 2.000-2.299 – pewną identyfikację do rodzaju i prawdopodobną identyfikację gatunkową, 1.700-1.999 – prawdopodobną identyfikacja do poziomu rodzaju, a wynik o log(score) 0.000-1.699 to identyfikacja niewiarygodna. W przeprowadzonych badaniach dowiodłam, że w przypadku zastosowania metody bezpośredniej lub bezpośredniej z ekstrakcją na płytce (przy użyciu 70% kwasu mrówkowego) wiarygodne wyniki identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus* mieszczą się nie tylko w zakresie log(score) 2.000-3000, ale także w przedziale 1.700-1.999. Uzyskanie takich wniosków było możliwe dzięki zastosowaniu w badaniu referencyjnych szczepów *Lactobacillus* równolegle ze szczepami dzikimi oraz porównania uzyskanych wyników identyfikacji w spektrometrze masowym z metodami opartymi na analizie rybosomalnego DNA (rDNA) (praca nr 1 i 4).

Przeprowadzone badania wykazały, że SM typu MALDI-TOF jest bardzo wartościowym narzędziem do identyfikacji lactobacilli, jednak nie zawsze pozwala na jednoznaczną dyskryminację blisko spokrewnionych gatunków *Lactobacillus,* tj. *L. johnsonii* i *L. gasseri* (praca nr 1, 4, 5, 7), *L. casei* i *L. zeae* czy *L. amylovorus* i *L. kitasatonis* (praca nr 1 i 4). W przypadku izolatów przynależnych do ww. gatunków uzyskiwano dwa rozbieżne wyniki identyfikacji o bardzo zbliżonych wartościach log(score). W pracy nr 4 zaproponowałam, aby za wiarygodny uznawać wynik o najwyższej wartości log(score) jeśli przynajmniej dwa najlepsze dopasowania (1.700-3.000) wskazują ten sam gatunek. Natomiast w przypadku kiedy dwa pierwsze dopasowania wskazują różne gatunki, za wiarygodny można uznać pierwszy z nich pod warunkiem, że różnica pomiędzy wartościami log(score) jest >0.30. Jeśli różnica jest mniejsza wskazane jest przeprowadzenie dokładniejszej identyfikacji za pomocą metod genetycznych.

Izolacja DNA z lactobacilli

Różnicowanie oparte na metodach genetycznych (oraz detekcja genów oporności) wymagało pozyskania materiału genetycznego z bakterii, co w przypadku lactobacilli nie jest sprawą łatwą ze względu na występowanie u nich grubej ściany komórkowej. Po przetestowaniu kilku wariantów (m.in. metody polegającej na kilkukrotnym zamrażaniu i odmrażaniu zawiesiny bakteryjnej) ostatecznie w pierwszym etapie izolacji DNA stosowałam wydłużoną inkubację bakterii, tj. 1-1,5 godz. w buforze z dodatkiem odpowiedniego stężenia lizozymu i mutanolizyny. Opracowana metodyka łącznie z całym protokołem ekstrakcji DNA za pomocą mieszaniny fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego pozwalała na pozyskiwanie

znacznych stężeń DNA o wysokiej czystości (praca nr 1). W podobny sposób usuwałam ścianę komórkową lactobacilli przy wykorzystaniu komercyjnego zestawu (Eurx) do izolacji DNA z kolumienkami ze złożem wiążącym DNA (praca nr 4, 6 i 7).

Identyfikacja lactobacilli oparta o analizę rybosomalnego DNA

Gen kodujący 16S rRNA jest najczęstszym celem molekularnym stosowanym w badaniach taksonomicznych. Oprócz wysoce konserwatywnych miejsc (stosowanych do wiązania uniwersalnych starterów), zawiera on gatunkowo-specyficzne regiony hiperzmienne (Chakravorty i wsp. 2007). Do różnicowania gatunkowego bakterii można wykorzystywać także regiony zlokalizowane pomiędzy 16S i 23S rDNA określane jako 16S-23S rDNA lub ITS (Internal Transcribed Spacer). Zawierają one geny tRNA i charakteryzują się wysokim stopniem zmienności (pomiędzy gatunkami), zarówno pod względem sekwencji nukleotydowej jak i długości (Liguori i wsp. 2011). Sekwencjonowanie 16S rDNA jest standardową metodą identyfikacji bakterii, ale ze względów finansowych i technicznych wykonywaną głównie w laboratoriach referencyjnych. Z tego względu w prezentowanych pracach zaproponowałam alternatywne metody rybotypowania, o porównywalnej rozdzielczości do sekwencjonowanie 16S rDNA, a przy tym możliwe do wykonania w każdym laboratorium biologii molekularnej.

Zastosowana podczas przeprowadzonych badań identyfikacja bakterii za pomocą techniki 16S-ARDRA (16S Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) oparta jest na analizie porównawczej elektroforetycznych profili restrykcyjnych amplikonów 16S rDNA izolatów terenowych z profilami szczepów referencyjnych. Opracowanie protokołów metody dla pałeczek *Lactobacillus* wymagało wytypowania enzymów restrykcyjnych (*Mse*I, *Hinf*I, *Mbo*I i *Alu*I), których użycie zapewniło dużą siłę dyskryminacji. Do tego celu wykorzystałam analizę *in silico* przy użyciu programu CLC Main Workbench (Qiagen) i sekwencji nukleotydowych 16S rDNA szczepów *Lactobacillus* zdeponowanych w bazie GenBanku. W pracy nr 4 zamieściłam profile restrykcyjne 23 gatunków *Lactobacillus* (szczepy referencyjne i dzikie) uzyskane po trawieniu 16S rDNA wybranymi enzymami. Opracowane przeze mnie protokoły analizy restrykcyjnej 16S rDNA pozwalają na identyfikację gatunkową lactobacilli występujących u drobiu, w tym na odróżnienie nawet blisko spokrewnionych gatunków, których często nie udaje się jednoznacznie zróżnicować za pomocą SM typu MALDI-TOF. Przykładowo, zastosowanie enzymu *Mse*I pozwala na odróżnienie *L. johnsonii* od *L. gasseri*, a także *L. amylovorus* od *L. kitasatonis*; *Mbo*I i *Hinf*I umożliwiają częściową dyskryminację gatunków grupy *L. casei* (*L. casei, L. paracasei, L. rhamnosus, L. zeae*), a *Alu*I zapewnia wyraźne zróżnicowanie gatunków

przynależnych do grupy *L. salivarius*, tj. *L. salivarius*, *L. agilis* i *L. saerimneri* (praca nr 4).

Wykazałam również, że analiza profili restrykcyjnych 16S rDNA pozwala na przyporządkowanie poszczególnych gatunków *Lactobacillus* do grup taksonomicznych ustanowionych na podstawie analizy sekwencji 16S rDNA. W pracy nr 4 zamieściłam dendrogram obrazujący podobieństwo genetyczne pomiędzy izolatami różnych gatunków *Lactobacillus* pochodzących od kur, gęsi i indyków. Aktualnie w obrębie rodzaju *Lactobacillus* wyróżnia się 15 dużych grup filogenetycznych, 7 małych grup zawierających po dwa gatunki oraz 7 grup reprezentowanych przez pojedyncze gatunki *Lactobacillus* (Zhang i Cai 2014).

W pracy nr 1 przedstawiłam opracowane przez mnie protokoły identyfikacji lactobacilli oparte o analizę regionów 16S-23S rDNA. Metoda ta, polegająca na analizie porównawczej profili elektroforetycznych produktów PCR będących odpowiednikami tych regionów rDNA, okazała się przydatna do identyfikacji gatunkowej bakterii *Lactobacillus* występujących u drobiu, ale jej siła dyskryminacji jest niewystarczająca do różnicowania blisko spokrewnionych gatunków, tj. *L. amylovorus* i *L. kitasatonis* oraz gatunków przynależnych do grupy *L. casei*. W przypadku tych gatunków opracowałam metodykę dalszego postępowania polegającego na analizie restrykcyjnej regionów 16S-23S rDNA z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych *Taq*I i *Mse*I. Przeprowadzone badania wykazały, że technika ITS-PCR oraz ITS/RFLP (ITS/Restriction Fragment Length Polymorphism) jest skuteczna nie tylko w identyfikacji do poziomu gatunku, ale także pozwala na różnicowanie wewnątrzgatunkowe.

Zastosowanie wyżej opisanych metod genotypowania z wykorzystaniem rDNA wymagało nie tylko wytypowania odpowiednich enzymów restrykcyjnych ale także optymalizacji warunków reakcji PCR, trawienia rDNA oraz elektroforezy. Ponieważ na wstępnym etapie badań zaobserwowałam, że czystość amplikonów 16S rDNA w dużej mierze jest uzależniona od rodzaju stosowanej polimerazy DNA przeprowadziłam skrining prowadzący do selekcji enzymu pozwalającego na uzyskiwanie pojedynczego produktu PCR. W celu optymalizacji reakcji amplifikacji regionów 16S-23S rDNA przetestowałam kilka starterów (L1, L2, G1) oraz różne warianty czasowo-temperaturowe (praca nr 1). Za optymalny czas trawienia amplikonów przy użyciu enzymów restrykcyjnych tradycyjnych (nie FastDigest) uznałam 4 godz. Krótszy czas był niewystarczający do strawienia całej puli DNA, a dłuższa inkubacja mieszaniny restrykcyjnej nie zmieniała obrazu na żelu. W związku z niezadowalającym efektem rozdziału fragmentów restrykcyjnych DNA (szczególnie tych o małej wielkości) w standardowym żelu agarozowym w technice 16S-ARDRA ostatecznie zastosowałam

agarozę wysokorozdzielczą o stężeniu 3%, a w metodzie opartej o analizę regionów 16S-23S wykorzystałam elektroforezę pionową w żelu poliakrylamidowym.

Reasumując badania mające na celu identyfikację gatunkową pałeczek *Lactobacillus* występujących u drobiu stwierdzam, że najbardziej wygodną metodą do różnicowania lactobacilli jest SM typu MALDI-TOF. Technika ta pozwala na bardzo szybką identyfikację dużej liczby zebranych izolatów przy małym nakładzie pracy. Koszty identyfikacji są uzależnione od kilku czynników (stawki ustanowione przez laboratorium zewnętrzne, rodzaj użytych w badaniu odczynników tj. matryca i wzorzec masowy), ale zwykle są konkurencyjne w porównaniu do kosztów identyfikacji metodami opartymi o analizę materiału genetycznego. W przypadku uzyskania wyników niejednoznacznych można zastosować zaproponowane w pracach nr 1 i 4 protokoły oparte o analizę profili elektroforetycznych 16S-23S rDNA lub profili restrykcyjnych 16S rDNA i 16S-23S rDNA. Główną zaletą tych metod jest możliwość ich rutynowego stosowania w laboratoriach ze względu na stosukowo proste protokoły wykonania oraz brak konieczności posiadania specjalistycznego sprzętu (sekwenator DNA, spektrometr masowy). W obu technikach do amplifikacji stosuje się uniwersalne startery. Siła dyskryminacji 16S-ARDRA oraz ITS/RFLP zależy od rodzaju użytych enzymów restrykcyjnych, a na koszt badań składa się przede wszystkim cena szczepów referencyjnych, zestawów do izolacji DNA bakteryjnego oraz odczynników do reakcji PCR i trawienia amplikonów.

III.b) Ocena potencjału probiotycznego lactobacilli występujących u drobiu (praca nr 2, 5 i 7)

Przemysł drobiarski jest jednym z najszybciej rozwijających się segmentów sektora hodowlanego na świecie. Polska pozostaje obecnie największym producentem i wiodącym eksporterem mięsa drobiowego w Unii Europejskiej (www.ec.europa.eu). Wprowadzenie nowoczesnych systemów intensywnej hodowli sprawiło, że produkcja drobiu stała się opłacalna. Z drugiej jednak strony fermy oparte na systemach zamkniętych obarczone są pewnym ryzykiem, które może nieść ze sobą poważne konsekwencje dla stada. Ptaki hodowane w takich systemach narażone są na liczne czynniki stresogenne (zbyt duża obsada ptaków, nieprawidłowe żywienie, nieodpowiednie warunki utrzymania, transport, szczepienie), które mogą zaburzać prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Stres wpływa negatywnie na zdrowotność ptaków i obniża wskaźniki ich wzrostu i rozwoju. Następuje osłabienie układu odpornościowego na zakażenia wywołane wirusami, bakteriami, pierwotniakami i grzybami jak również ujawniają się nieprawidłowości metaboliczne. Dużemu zagęszczeniu ptaków sprzyja szybkie rozprzestrzenianie się zarazków, które mogą

przenosić się zarówno drogą bezpośredniego kontaktu lub pośrednio poprzez zanieczyszczoną patogenem paszę lub wodę (Lutful Kabir 2009, Burkholder i wsp. 2008).

Zakażenia jelitowe na tle bakteryjnym są jednym z najistotniejszych problemów z jakim zmagają się hodowcy drobiu i lekarze weterynarii. Do najczęściej występujących zalicza się nekrotyczne zapalanie jelit, salmonellozę i kolibakteriozę. Infekcje wywołane przez *Clostridium perfringens, Salmonella* spp. i *Escherichia coli* są przyczyną znacznych strat ekonomicznych na całym świecie spowodowanych upadkami w stadach, kosztami leczenia, zmniejszonym tempem wzrostu, słabym wykorzystaniem paszy oraz kontaminacją produktów drobiowych. Transmisja ww. drobnoustrojów z przewodu pokarmowego do innych organów i jaj może skutkować zmniejszeniem nieśności, płodności i niską wykluwalnością zakażonych jaj (Lutful Kabir 2010, M'Sadeq i wsp. 2015). Infekcje jelitowe przebiegające w formie subklinicznej, bez widocznych symptomów chorobowych, ze względu na utrudnione rozpoznanie są przyczyną najdotkliwszych strat ekonomicznych. W Europie liczba diagnozowanych zakażeń jelitowych u drobiu, szczególnie na tle *C. perfringens,* wzrosła po roku 2006, kiedy to wycofano antybiotykowe stymulatory wzrostu z listy dostępnych dodatków paszowych (M'Sadeq i wsp. 2015). Wprowadzone regulacje, a także zwiększenie świadomości na temat zdrowej żywności, skłaniają do poszukiwania alternatywnych metod zapobiegania infekcjom jelit u drobiu. Jedna ze strategii opiera się na wykorzystaniu dodatków paszowych w postaci mikroorganizmów probiotycznych.

Bakteryjne infekcje drobiu nie tylko obniżają wskaźniki produkcji, ale także są przyczyną zachorowań wśród ludzi. Poza *Salmonellą* i patogennymi szczepami *E. coli* produkty pochodzenia drobiowego ulegają kontaminacji bakteriami z rodzaju *Campylobacter,* które są obecnie najczęściej izolowanymi czynnikami etiologicznymi wywołującymi zatrucia pokarmowe u ludzi w krajach UE (EFSA 2015, Mitchell i wsp. 2015). Pałeczki *Campylobacter* są składową mikroflory jelitowej kur i zwykle nie powoduje żadnych objawów chorobowych u kurcząt, chociaż niektóre badania donoszą, że bakterie te mogą być przyczyną rozszerzanie jelita czczego, krwotocznego zapalenia jelit lub ogniskowej martwicy wątroby (Workman i wsp. 2005). Łatwość rozprzestrzeniania się zarazka w stadzie i brak objawów zakażenia u ptaków przekładają się na obecność patogena na liniach technologicznych rzeźni drobiowych. Człowiek zakaża się *Campylobacter* głównie poprzez kontakt z surowym mięsem drobiowym (EFSA 2015). W 2011 r. Panel EFSA ds. zagrożeń biologicznych (BIOHAZ) wydał rekomendacje dotyczące kontrolowania występowania tych bakterii w pierwotnej produkcji brojlerów i wdrażanie zasad GMP-HACCP (Good

Manufacturing Practice-Hazard Analysis and Critical Control Points) podczas uboju. Szacuje się, że redukcja liczby *Campylobacter* w treści jelitowej u kur (ok. 10^8 jtk/gram treści jelitowej) o $3\log_{10}$ zmniejszyłaby ryzyko w zakresie zdrowia publicznego o co najmniej 90% (EFSA 2011). Wśród skutecznych strategii ograniczenia występowania *Campylobacter* na fermach drobiu wymienia się stosowanie żywieniowych dodatków mikrobiologicznych.

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* ze względu na niepatogenność, zdolność do zasiedlania błon śluzowych oraz działanie prozdrowotne są uznanymi kandydatami na probiotyki. Jednakże nie wszystkie lactobacilli wywierają jednakowy wpływ na organizmu gospodarza. Właściwości probiotyczne zależą od szczepu, a nie od gatunku czy rodzaju drobnoustroju. Aktualnie z żywieniu zwierząt, w tym drobiu, stosuje się preparaty probiotyczne zawierające najczęściej bakterie z rodzaju *Enterococcus*, rzadziej *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Stosowanie enterokoków jako probiotyków budzi jednak spore wątpliwości. Bakterie z tego rodzaju wykazują łatwość nabywania i przenoszenia genów oporności oraz wirulencji przez co szczepy pierwotnie niepatogenne i antybiotykowrażliwe mogą ulec transformacji do patogenów wywołujących trudne do zwalczenia infekcje. Żaden gatunek *Enterococcus* nie posiada aktualnie (począwszy od 2014 r.) statusu bezpieczeństwa stosowania QPS wymaganego dla dodatków paszowych przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA 2018). W związku z tym, że zezwolenia wydawane są przez EFSA na 10 lat, preparaty zawierające enterococci, które zostały zarejestrowane przed 2014 r. znikną prawdopodobnie w ciągu kilku najbliższych lat z rynku europejskiego. Informacje te są dodatkowym argumentem przemawiającym za podjęciem badań mających na celu poszukiwanie nowych bezpiecznych i skutecznych szczepów probiotycznych dla drobiu. Nie bez znaczenia jest również fakt, że drobnoustroje występujące w rynkowych preparatach weterynaryjnych nie zawsze pochodzą od gatunku, dla którego są przeznaczone, a niektóre produkty skierowane są do szerszego grona gospodarzy, charakteryzujących się odmienną anatomią i fizjologią przewodu pokarmowego. I choć regulacje prawne nie zabraniają takiego działania to probiotyki takie nie spełniają kryteriów opisanych w Rozdz. I., a ich skuteczność może być ograniczona.

Oceniając potencjał probiotyczny zebranych izolatów *Lactobacillus* pod uwagę brałam następujące aspekty:

- tożsamość taksonomiczną (Rozdz. III.a)
- aktywność przeciwdrobnoustrojową,
- tolerancję na warunki przewodu pokarmowego
- antybiotykowrażliwość (Rozdz. III.c).

Do selekcji szczepów probiotycznych wykorzystywałam testy *in vitro,* które są standardowym narzędziem przesiewowym.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa probiotyków wynikająca z ich zdolności do adhezji do nabłonka jelit oraz wytwarzania substancji przeciwdrobnoustrojowych umożliwia wypieranie mikroflory niekorzystnej i patogennej i zapewnia szczepom probiotycznym przetrwanie i/lub dominację w środowisku docelowym. Podczas przeprowadzonych badań oceniłam aktywność przeciwbakteryjną zebranych izolatów *Lactobacillus* w stosunku do takich patogenów drobiu jak *Salmonella enterica, Escherichia coli, Clostridium perfringens, Pasteurella multocida, Riemerella anatipestifer, Staphylococcus aureus, Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. W pracy nr 5 wykazałam, że wszystkie użyte w badaniu izolaty *Lactobacillus* od kur, w liczbie 90, produkowały na podłożu agarowym (metoda słupków agarowych) substancje hamujące wzrost bakterii patogennych wyizolowanych z przypadków klinicznych od drobiu. Szczególnym antagonizmem cechowały się izolaty *L. salivarius.* Największą wrażliwością na działanie metabolitów lactobacilli odznaczały się szczepy *C. perfringens* (średnia średnica zahamowania wzrostu 16,9±0,32 mm, przy średnicy słupka 9 mm), a najmniejszą *E. coli* (10,3±1,8 mm). W przypadku *Salmonelli* zaobserwowałam statystycznie istotne różnice pomiędzy wrażliwością określonych serotypów na metabolity lactobacilli – strefy zahamowania wzrostu S. Typhimurium (12,75±0,07 mm) były większe od stref uzyskanych dla *S.* Enteritidis (10,9±2,30 mm) i *S.* Newport (11,0±2,10 mm). Podczas przeprowadzonych badań wytypowałam 15 izolatów *Lactobacillus* odznaczających się najsilniejszym antagonizmem wobec ww. bakteryjnych patogenów drobiu. Szczególnie interesujące wydają się szczepy *L. ingluviei* 9e i 18b oraz *L. salivarius* 10d, które silnie wybiórczo hamowały wzrost *C. perfringens* (praca nr 5). Lactobacilli izolowane od gęsi wykazywały silne działanie hamujące w stosunku do *P. multocida* (15,2±4,20 mm) i *Riemerella anatipestifer* (16,0±4,60 mm), natomiast pozostałe szczepy wskaźnikowe, tj. *E. coli* (10,1±1,50 mm), *S. aureus* (10,5±2,00 m) i *S.* Enteritidis (11,7±0,00 mm) cechowały się mniejszą wrażliwością na antagonistyczne działanie lactobacilli (praca nr 2). Podobne rezultaty uzyskali Kizerwetter-Świda i Binek (2005), którzy w testach *in vitro* zaobserwowali silniejszy antagonistyczny efekt lactobacilli pochodzących od kur wobec bakterii Gram-dodatnich, tj. *C. perfringens* niż wobec *E. coli* i *Salmonella* Enteritidis. Jin i in. (1996) i Taheri i in. (2009) wykazali, że izolaty *Lactobacillus* od kur były bardziej skuteczne w hamowaniu wzrostu *Salmonelli* niż *E. coli*, ale w przeciwieństwie do wyników moich badań autorzy ci nie zaobserwowali większej wrażliwości *S.* Typhimurium w porównaniu z *S.* Enteritidis. W pracy nr 7 wykazałam, że wszystkie spośród 46

badanych izolatów pochodzących od kur hamowały wzrost terenowych szczepów *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* w metodzie słupków agarowych. Najsilniejsze działanie antagonistyczne wywierały izolaty *L. salivarius* (średnia średnica zahamowania wzrostu 21±2,0 mm) i *L. reuteri* (20,3±2,3 mm). Natomiast izolaty *L. johnsonii, L. saerimneri, L. oris,* podobnie jak w przypadku innych bakterii wskaźnikowych (*S. enterica, E. coli, C. perfringens*) odznaczały się najsłabszym działaniem inhibicyjnym.

Aby określić mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego bakterii *Lactobacillus*, analizowałam aktywność medium pohodowlanego i zdolność izolatów do syntezy nadtlenku wodoru. Jednakże, zastosowane metody nie pozwoliły jednoznacznie określić, które substancje wytwarzane przez pałeczki kwasu mlekowego rosnące na agarze hamowały wzrost bakterii patogennych. Antagonistyczne działanie natywnego medium uzyskanego po hodowli większości izolatów *Lactobacillus,* które wykazywały działanie inhibicyjne w stosunku do bakterii wskaźnikowych w metodzie słupków agarowych, była słaba lub zerowa. Zjawisko to, obserwowane również przez niektórych autorów (Polak-Berecka i wsp 2009), można wyjaśnić faktem, że na uwalnianie substancji przeciwdrobnoustrojowych przez pałeczki fermentacji mlekowej mają wpływ gęstość komórek i kinetyka populacji, które są odmienne podczas wzrostu na agarze i w bulionie (Aasen i wsp. 2000). Ponadto bakterie *Lactobacillus* hodowane na podłożu agarowym mogą syntetyzować bakteriocyny w znacznie większych ilościach niż w hodowli płynnej (Sip 1999). Natywne media pohodowlane (pH ≤5,1) wywierały najsilniejszy efekt hamujący w stosunku do *R. anatipestifer, P. multocida* i *S.* Enteritidis (średnia średnica zahamowania wzrostu >11,8 mm). Po neutralizacji kwasów organicznych pierwotnie aktywne supernatanty całkiem traciły zdolność do hamowania wzrostu szczepów wskaźnikowych (praca nr 2 i 5). Wyniki te dowodzą, że niskie pH bulionu powstające na skutek wytwarzania kwasu mlekowego przez lactobacilli odgrywa rolę w obserwowanym działaniu inhibicyjnym. Podobne wnioski przedstawili Garriaga i wsp. (1998), którzy wykazali antagonizm natywnego, ale nie zneutralizowanego, medium uzyskanego po hodowli pałeczek fermentacji mlekowej od kur wobec takich bakterii jak *Salmonella* Enteritidis i *E. coli*. Neal-McKinney i wsp. (2012) dowiedli, że kwas mlekowy zakłóca funkcjonowanie błony komórkowej *C. jejuni* i jest odpowiedzialny za hamowanie wzrostu tych bakterii *in vitro*, a także redukuje ich kolonizacje u kurcząt.

Ogromna większość lactobacilli pozyskanych od gęsi oraz wszystkie izolaty od kur wykazywały zdolność do wytwarzania H_2O_2, a intensywność produkcji tej reaktywnej formy tlenu, oceniana według 4-stopniowej skali (+++, ++, +, –), była skorelowana z gatunkiem *Lactobacillus*. Najbardziej intensywne niebieskie zabarwienie

kolonii (+++) na agarze MRS z dodatkiem TMB i peroksydazy chrzanowej pojawiało się w przypadku izolatów *L. johnsonii, L. ingluviei, L. agilis, L. saerimneri, L. oris* oraz u niektórych izolatów *L. crispatus i L. salivarius.* Nie odnotowałam natomiast związku pomiędzy sekrecją H_2O_2, a aktywnością przeciwbakteryjną lactobacilli obserwowaną w metodzie słupków agarowych (praca nr 2, 5 i 7).

Korzystne działanie pałeczek kwasu mlekowego jest w dużej mierze zależne od ich zdolności do kolonizacji środowiska przewodu pokarmowego. Adhezja do komórek nabłonkowych determinująca trwałe zasiedlanie nisz docelowych przez lactobacilli opiera się na działaniu sił pasywnych, elektrostatycznych i hydrofobowych. W przypadku niektórych lactobacilli istotną rolę odgrywa także specyficzne wiązanie zależne od adhezyn powierzchniowych tych bakterii (Grover i wsp. 2013). Wielu autorów odnotowało dodatnią korelację pomiędzy stopniem hydrofobowości bakterii *Lactobacillus* a ich zdolnością do adhezji do komórek nabłonkowych (Ehrmann i wsp. 2002, Kos i wsp. 2003, Taheri i wsp. 2009). W przeprowadzonych badaniach (praca nr 5 i 7) wykazałam, że aż 99% izolatów *Lactobacillus* od kur cechuje się hydrofobową powierzchnią komórki, a dla większości (65,5%) hydrofobowość oszacowana w metodzie z ksylenem (ocena adhezji bakterii do węglowodoru) mieściła się w zakresie 90-100%. Wykazano, że zdolność pałeczek *Lactobacillus* do przylegania do śluzówki jelita odgrywa istotną rolę w hamowaniu kolonizacji *Campylobacter* sp. u kurcząt (Ganan i wsp. 2013), a szczepy *Lactobacillus* charakteryzujące się najwyższą hydrofobowością najlepiej hamowały inwazję *C. jejuni* w testach wykluczania (Wang i wsp. 2014).

Tolerancja na niskie pH i sole żółci oraz zdolność do tworzenia biofilmu

Ogromna większość zebranych izolatów *Lactobacillus* pochodzących zarówno od gęsi jak i od kur odznaczała się opornością na niskie pH i sole żółci (praca nr 2 i 7). Cechy te są niezmiernie istotne w przypadku szczepów probiotycznych, gdyż zapewniają przetrwanie bakteriom podczas pasażu przez żołądek i dwunastnicę. Wszystkie poddane badaniu lactobacilli od kur, w liczbie 46, wykazywały zdolność do przeżycia przez co najmniej 2 godziny w bulionie MRS o pH 2,0, a większość z nich zachowywała żywotność nawet po 1-godzinnej inkubacji w pH 1,5 (praca nr 7). Mniejszą tolerancję na niskie pH obserwowałam w przypadku lactobacilli izolowanych od gęsi – 59% izolatów przetrwało 1 godz. w pH 2,5, a tylko 10% w pH 2.0 (praca nr 2). Te różnice w tolerancji na niskie pH pomiędzy izolatami od gęsi i kurcząt mają odzwierciedlenie w wartościach pH treści gastrycznej ptaków; pH w żołądku gęsi waha

się od 3,5 do 5,0, w zależności od treści pokarmowej, a u kur wartości te mieszczą się w zakresie 1,9-4,5 (średnio 3,5) (Clemens i wsp. 1975, Svihus 2014).

100% izolatów od gęsi i 89% izolatów od kur zachowywało żywotność po 24-godzinnej inkubacji w podłożu MRS z dodatkiem 2% soli żółci. Co więcej, ponad 20% izolatów od kur i gęsi odznaczało się dobrym wzrostem w bulionie suplementowanym żółcią, a gęstość optyczna niektórych izolatów mierzona po 24 godz. wynosiła nawet >88% w stosunku do kontroli dodatniej (100%). Wysoka tolerancja na żółci objawiająca się wzrostem bakterii w obecności jej soli była charakterystyczna dla izolatów *L. reuteri* i *L. plantarum*. Natomiast w przypadku pozostałych gatunków cecha ta wydaje się być skorelowana ze szczepem a nie z gatunkiem (praca nr 2 i 7).

Duży odsetek (50%) izolatów *Lactobacillus* od kur wykazywał *in vitro* zdolność do tworzenia biofilmu. Ta ceniona cecha szczepów probiotycznych była znamienna dla izolatów *L. reuteri* i *L. oris* oraz dla wybranych izolatów innych gatunków (praca nr 7). Biofilm pozwala przetrwać bakteriom w trudnych warunkach środowiskowych i umożliwia kolonizację nisz docelowych. Macierz polisachrydowa biofilmu chroni komórki przed antybiotykami i enzymami, a także wspiera wytwarzanie mikrośrodowiska, w którym zachodzą interakcje metaboliczne populacji. Zdolności do tworzenia biofilmu zależy od wielu czynników, w tym parametrów środowiskowych, takich jak tekstura powierzchni (szorstka lub gładka), hydrofobowość, pH, stężenie składników odżywczych i temperatura i dlatego należy wziąć pod uwagę, że aktywność izolatów pozytywnie ocenionych w testach *in vitro* może być odmienna w warunkach *in vivo* (Salas-Jara i wsp. 2016).

Podsumowując opisane wyżej wyniki badań należy stwierdzić, że lactobacilli występujące u kurcząt i gęsi mają wysoki potencjał probiotyczny, który w wielu aspektach skorelowany jest z gatunkiem *Lactobacillus*. Izolaty, które silnie hamowały wzrost patogenów bakteryjnych i wykazywały wysoką hydrofobowość, zdolność do wytwarzania H_2O_2 i tworzenia biofilmu oraz tolerancję na niskie pH i sole żółci mogą mieć zastosowanie w przywracaniu równowagi mikroflory jelitowej ptaków i stanowić alternatywę dla antybiotykoterapii. Jednakże, należy podkreślić, że istotnym kryterium ograniczającym praktyczne zastosowanie wielu z badanych izolatów jest ich antybiotykooporność. Wśród 46 izolatów *Lactobacillus* od kur wykorzystanych w badaniach opisanych w pracy nr 7 większość odznaczała się silną aktywnością anty-*Campylobacter* i innymi cechami probiotycznymi, ale jedynie 9 izolatów spełniało kryteria EFSA stawiane dodatkom paszowym w zakresie antybiotykowrażliwości.

III.c) Antybiotykowrażliwość pałeczek *Lactobacillus* izolowanych od drobiu (praca nr 3 i 6)

Antybiotyki stosowane są w produkcji zwierzęcej, w tym również drobiarskiej, od lat 50 ubiegłego wieku. Ich częsta aplikacja nie tylko w celach terapeutycznych ale i profilaktycznych oraz wieloletnie stosowanie antybiotykowych stymulatorów wzrostu zwierząt doprowadziły do powstania lekoopornych szczepów bakteryjnych, zarówno patogennych jak i niechorobotwórczych. Hipoteza, iż mikroflora przewodu pokarmowego, w skład której wchodzą lactobacilli, stanowi rezerwuar genów oporności jest powszechnie akceptowana i coraz częstej znajduje poparcie w wynikach badań naukowych. Ogromna liczba i duże zagęszczenie mikroorganizmów w ekosystemie jelit ułatwia wymianę genów oporności pomiędzy członkami tej mikrobioty, a transfer horyzontalny odgrywa decydującą rolę w narastaniu lekooporności bakterii (Schjørring i Krogfelt 2011).

Ocena wrażliwości na antybiotyki jest jednym z kluczowych etapów selekcji szczepów probiotycznych. Wskazane jest by probiotyki posiadały oporność naturalną, która umożliwia im przetrwanie w przewodzie pokarmowym podczas antybiotykoterapii, a jednocześnie nie mogą posiadać genów oporności zlokalizowanych na elementach mobilnych genomu ze względu na ryzyko ich transferu do bakterii potencjalnie chorobotwórczych lub patogenów jelitowych (EFSA 2012).

Publikacje nr 3 i 6 składające się na prezentowane osiągnięcie naukowe są pierwszymi doniesieniami nt. antybiotykowrażliwości lactobacilli występujących u drobiu w Polsce i jednymi z nielicznych w literaturze światowej. Zgodnie z moją wiedzą istnieją tylko dwie wiarygodne prace (Cauwerts i wsp. 2006a, Cauwerts i wsp. 2006b) przedstawiające fenotypową i genotypową wrażliwości lactobacilli izolowanych od kur broilerów w Belgii na tetracykliny i antybiotyki grupy MLS (makrolidy, linkozamidy i streptograminy).

Antybiotykowrażliwość fenotypowa

Do fenotypowej oceny wrażliwości lactobacilli na antybiotyki i chemioterapeutyki używałam metody mikrorozcieńczeń w bulionie pozwalającej na wyznaczenie wartości MIC (minimal inhibitory concentration). Metoda ta jest dużo bardziej pracochłonna niż metoda dyfuzyjno-krążkowa, ale pozwala na uzyskanie dokładniejszychych wyników. Poza tym wyznaczanie wartości MIC jest zalecane przez EFSA (EFSA 2012) podczas selekcji mikrobiologicznych dodatków paszowych. Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) nie podaje norm dla

bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Wartości graniczne MIC zaproponowane przez CLSI (M-45) (Clinical & Laboratory Standards Institute) nie uwzględniają zróżnicowania gatunkowego, a rekomendowana procedura badania nie jest dostosowana do wymagań wzrostowych większości gatunków *Lactobacillus* (hodowla w bulionie Müeller-Hinton z dodatkiem 2,5-5% v/v zliofilizowanej krwi końskiej, warunki tlenowe). W związku z tym do interpretacji wyników antybiotykowrażliwości izolatów *Lactobacillus* stosowałam rekomendacje EFSA (2012) lub używałam własnych kryteriów oceny. Proponując punkty odcięcia dla leków nie ujętych w normach EFSA, tj. linkomycyna, neomycyna, tiamulina, enrofloksacyna, flumechina, kierowałam się przede wszystkim rozkładem wartości MIC (bimodalny/unimodalny). W przypadku doksycykliny i tylozyny adoptowałam punkty odcięcia ustanowione przez EFSA (2012) dla tetracykliny i erytromycyny, odpowiednio. Aby porównać odsetek szczepów opornych *Lactobacillus* pochodzących od gęsi i kur, na potrzeby przedstawionego autoreferatu ujednoliciłam kryteria oceny dotyczące ampicyliny, tetracyklin i makrolidów (pierwotne kryteria jakie użyłam do interpretacji wyników w przypadku lactobacilli od gęsi zastąpiłam kryteriami EFSA).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały powszechne występowanie szczepów antybiotykoopornych wśród lactobacilli izolowanych od drobiu w Polsce. Oporność ta dotyczy substancji przeciwdrobnoustrojowych przynależnych do różnych grup, tj. antybiotyki β-laktamowe (odsetek szczepów opornych 26-29%), tetracykliny (41-74%), makrolidy (21,5-42%), linkozamidy (15-70%), aminoglikozydy (12,5-31%), chloramfenikole (23%), fluorochinolony (23-56%), pleuromutyliny (90%) (Tab. 1). Szczególnie dużą liczbę szczepów opornych odnotowałam wśród lactobacilli pochodzących z ferm kurzych. W przypadku lactobacilli od gęsi odsetek szczepów opornych na wszystkich badane substancje przeciwdrobnoustrojowe poza ampicyliną, był mniejszy (w przypadku niektórych antybiotyków nawet 2-krotnie) niż wśród izolatów od kur (Tab. 1).

Tab. 1. Odsetek antybiotykoopornych izolatów wśród badanych lactobacilli.

	ampicylina (MIC≥2, ≥4 lub ≥8 µg/ml)	**tetracykliny** (MIC≥8, ≥16 lub ≥32 µg/ml)	**makrolidy** (MIC≥2 µg/ml)	**linkomycyna** (MIC≥16 lub ≥64 µg/ml)	**streptomycyna** (MIC≥32 lub ≥128 µg/ml)	**gentamycyna** (MIC≥16 lub ≥32 µg/ml)	**neomycyna** (MIC≥64 µg/ml)	**chloramfenikol** (MIC≥8 µg/ml)	**tiamulina** (MIC≥8 µg/ml)	**enrofloksacyna** (MIC≥64 µg/ml)	**flumechina** (MIC≥256 µg/ml)	**Oporność wieloraka**
gęsi	29%	41%	21,5%	15%	NT	NT	27%	NT	NT	23%	56%	21,5%
kury	26%	74%	42%	70%	31%	12,5%	1%	23%	90%	48%	34%	79,5%

NT- not tested, nie badano

Szczególnie niepokojąca wydaje się, nie odnotowywana dotychczas przez innych autorów, częstotliwość oporności (26-29%) na ampicylinę. Kmet i Piatnicowa (2010) oraz Shazali i wsp. (2014) wykazali, że występowanie lactobacilli opornych na penicyliny na fermach kurzych w Słowacji i Malezji jest sporadyczne (≤ 3.5%). Wysoki odsetek izolatów opornych na tetracykliny (74%) oraz makrolidy (42%) i linkozamidy (70%) wśród badanych lactobacilli od kur jest zbieżny z wynikami Cauwerts i wsp. (2006a), którzy wykazali, że blisko 80% lactobacilli pochodzących z ferm broilerów w Belgii jest opornych na tetracykliny, 78% na erytromycynę i aż 87% na linkomycynę. W przypadku antybiotyków aminoglikozydowych, z których w leczeniu drobiu w Polsce aktualnie stosowana jest tylko neomycyna, oporność odnotowywałam z umiarkowaną częstotliwością i wśród izolatów od kur z reguły dotyczyła ona streptomycyny (31%), rzadziej gentamycyny (12,5%). 27% izolatów *Lactobacillus* od gęsi i 1% izolatów od kur odznaczało się wysokimi wartościami MIC (≥64 µg/ml) dla neomycyny.

Prezentowane badania są pierwszymi doniesieniami nt. wrażliwości lactobacilli na tiamulinę – antybiotyk powszechnie stosowany w hodowli drobiu, głównie do kontrolowania chronicznej choroby oddechowej wywołanej przez mykoplazmy (van Duijkern i wsp. 2014). Na podstawie rozkładu wartości MIC w pracy nr 6 zaproponowałam przyjęcie stężenia 8 µg/ml jako granicznego punktu odcięcia do różnicowania szczepów wrażliwych i opornych. Niewielki odsetek (10%) izolatów *Lactobacillus* od kurcząt (10%) odznaczał się bardzo niskimi wartościami MIC dla tiamuliny, tj. ≤0,5 µg/ml. Wartości MIC o zakresie 8-256 µg/ml, odnotowane dla większości izolatów kurzych (90%) sugerują występowanie u lactobacilli oporności na ten antybiotyk.

Zakres wartości MIC dla chloramfenikolu był bardzo wąski w porównaniu z innymi antybiotykami. Dla ogromnej większości izolatów (96,5%) wartość MIC wynosiła 2, 4 lub 8 µg/ml, podczas gdy ustanowiony przez EFSA (EFSA 2012) punkt odcięcia to 4 µg/ml. 23% lactobacilli od kur zostało zakwalifikowanych jako oporne, ale w związku z obserwowanym rozkładem wartości MIC i brakiem korelacji pomiędzy opornością fenotypową a występowaniem genu *cat* determinującym oporność na chloramfenikol, wartym rozważenia wydaje się kwestia ponownej rewizji wyznaczonych dla tego antybiotyku punktów granicznych. Podobny zakres wartości MIC dla chloramfenikolu, tj. 1-8 µg/ml, był opisywany odnośnie pałeczek *Lactobacillus* także przez innych autorów (Mayrhofer i wsp. 2014), podczas gdy

wyższe wartości MIC (≥32 µg/ml) odnotowywano sporadycznie (Danielsen i Wind 2003).

Zgodnie z zaproponowanym punktem odcięcia odsetek izolatów opornych na enrofloksacynę (MIC≥64 µg/ml) wynosił od 23% (izolaty od gęsi) do 40% (izolaty od kur). Większość (56%) przebadanych lactobacilli od gęsi i 34% izolatów od kur odznaczała się także wysokimi wartościami MIC dla flumechiny (MIC≥256 µg/ml), która podobnie jak enrofloksacyna i difloksacyna jest chemioterapeutykiem o szerokim spektrum używanym często w hodowli drobiu do eradykacji salmonellozy, kolibacilozy i cholery drobiu (Cornejo i wsp. 2011).

Według ustalonych kryteriów aż 79,5% izolatów od kur odznaczało się opornością wieloraką (na min. 3 grupy antybiotyków), a wśród izolatów od gęsi odsetek ten wynosił 21,5%. Lactobacilli od kur oporne na erytromycynę i tetracyklinę cechowały się w każdym przypadku opornością krzyżową na tylozynę i doksycyklinę, odpowiednio, a 100% izolatów opornych na makrolidy wykazywało jednoczesną oporność na linkomycynę.

Wyraźny bimodalny rozkład wartości MIC świadczący o oporności nabytej odnotowałam w przypadku makrolidów, a także dla niektórych gatunków *Lactobacillus* w odniesieniu do tiamuliny. Rozkład wartości MIC tetracyklin i linkomycyny miał częściej charakter bimodalny niż unimodalny, ale dwubiegunowość nie była tak klarowna jak w przypadku makrolidów. Dystrybucję MIC dla penicylin, aminoglikozydów, chloramfenikolu i fluorochinolonów z reguły cechowała unimodalność.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na znaczne różnice we wrażliwości poszczególnych gatunków *Lactobacillus* na niektóre antybiotyki. Izolaty *L. salivarius* były mniej wrażliwe na streptomycynę (zakres MIC 32-≥1024 µg/ml) niż *L. johnsonii* i *L. crispatus* (MIC 1-64 µg/ml); wszystkie izolaty z gatunku *L. plantarum* odznaczały się wysokimi wartościami MIC dla tetracykliny (64 µg/ml), a *L. johnsonii* w porównaniu z izolatami innych gatunków wykazywały tendencję do mniejszej wrażliwości na fluorochinolony (praca nr 3 i 6). Te obserwacje potwierdzają potrzebę stosowania odmiennych punktów odcięcia dla poszczególnych gatunków bądź grup *Lactobacillus.*

Zaobserwowałam także znaczny dysonans jeśli chodzi o odsetek antybiotykoopornych izolatów *Lactobacillus* pochodzących z poszczególnych ferm drobiowych. W przypadku ośmiu rozpatrywanych kurników (I-VI-fermy broilerów, VII-VIII-fermy kur zielononóżek) zakres oporności na ampicylinę wynosił 9-62,5%, tetracykliny 14-100%, linkomycynę 8-100%, makrolidy 0-92%, streptomycynę 0-54%, gentamycynę 0-23,5%, chloramfenikol 0-53%, tiamulinę 75-100% i enrofloksacyna 25-

82% (praca nr 6). Najniższy odsetek izolatów wieloopornych (31-57%) i opornych na tetracyklinę (14-31%) odnotowałam w dwóch gospodarstwach (VII, VIII) hodujących kury zielononóżki. Historia stosowania antybiotyków na poszczególnych fermach nie została mi udostępniona, ale właściciele gospodarstw I-VI przyznali, że antybiotyki stosują u kur często, tzn. w przypadku każdego nowego wsadu kurcząt i to zarówno w celach leczniczych jak i prewencyjnych. Działanie to jest prawdopodobnie przyczyną powszechne występowania antybiotykoopornych lactobacilli na poddanych ewaluacji fermach broilerów.

Analiza genotypowych profili antybiotykooporności

W celu wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie oporności fenotypowej izolaty *Lactobacillus* pochodzące od kur poddałam skriningowi PCR służącemu detekcji genetycznych determinant oporności. Podczas badania uwzględniłam następujące geny i grupy antybiotyków:

- Tetracykliny – *tetM, tetK, tetL, tetO, tetQ, tetW;*
- Makrolidy i linkozamidy – *ermA, ermB, ermC, ermT, msrA/B, msrC, mefA/E, lnuA;*
- Aminoglikozydy – *aac(6')-Ie-aph(2")-Ia, aph3IIIa, ant(4')-Ia, aph(2")-Ic, aph(2")-Id, ant6-Ia, aac(6')-Ii, aadA, aadE;*
- Fenikole – *cat;*
- Pleuromutyliny – *lsaE, lsaC, cfr, vgaA, vgaAv;*
- Penicyliny – *blaZ, pbp5, mecA;*
- Różne antybiotyki – *acrA, mdeA, norA, mepA.*

Spośród 36 rozpatrywanych genów oporności u badanych lactobacilli wykryłam 14 (praca nr 6). Wykazałam, że powszechnie odnotowywana u izolatów od kurcząt oporność na tetracykliny (74% izolatów opornych) jest wynikiem obecności genów *tet* odpowiedzialnych za aktywne wypompowywanie antybiotyku z komórki (*tetL*) i ochronę rybosomów (*tetM, tetW*) (Chopra i Roberts 2001). Geny te wykryłam u 94% izolatów opornych na teracykliny, a z największą częstotliwością identyfikowałam gen *tetW* (u 45% izolatów), rzadziej *tetM* (26%) i *tetL* (24%). Występowanie tych genów odnotowali także Cauwerts i wsp. (2006a) pozyskanych lactobacilli pozyskanych z ferm broilerów w Belgii, a Klare i wsp. (2007) wykazali obecność *tetW* i *tetL* u szczepów *Lactobacillus* wyizolowanych od ludzi, z preparatów probiotycznych i z żywności.

U wszystkich izolatów z fenotypową opornością na erytromycynę i tylozynę występował gen *ermB* kodujący enzym katalizujący metylację w podjednostce 50S rybosomu bakteryjnego (w strukturze 23S rRNA), która jest miejscem uchwytu antybiotyków grupy MSL_B (macrolides, lincosamides and streptogramins B). Geny

ermC (kodujący metylazę) i *lnuA* (kodujący O-nukleotydylotransferazę) związane z opornością na makrolidy i linkozamidy były obecne u 12% i 39% izolatów, odpowiednio. Powszechne występowanie genu *ermB* u lactobacilli zebranych na fermach broilerów odnotowali także Cauwerts i wsp. (2006b); natomiast obecność genów *lnuA* i *ermC* wykrywali sporadycznie.

Spośród dziewięciu wykrywanych genów kodujących oporność na aminoglikozydy u lactobacilli zidentyfikowałam cztery, tj. *ant(6)-Ia* (u 10% izolatów) *i aadE* (5%), (determinujące oporność na streptomycynę) oraz bifunkcyjny gen *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* (8%) i *aph(2')-Ic* (6%) (nadające oporność na gentamycynę). Wymienione determinaty genetyczne, obok *ant(6), aac(6'), aph(3')-IIIa* i *aadA* należą do najczęściej wykrywanych u bakterii fermentacji mlekowej genów oporności na aminoglikozydy (Jaimee i Halami 2016). Ich obecność jest skorelowana z opornością fenotypową, ale zdarza się, podobnie jak w przypadku uzyskanych przez mnie wyników, że występują one także u pojedynczych izolatów antybiotykowrażliwych (Shao i wsp. 2015).

Wysokie wartości MIC dla tiamuliny odnotowane dla większości izolatów *Lactobacillus* od kur wskazują na oporność fenotypową, która może być skutkiem występowania u bakterii pomp wielolekowych (*vga* i *lsa*) lub mutacji w strukturze 23S rRNA lub w genach kodujących białka rybosomalne (tiamulina hamuje translację poprzez przyłączanie się do podjednostki 50S rybosmomu) (van Duijkern i wsp. 2014). Żaden z izolatów *Lactobacillus* nie zawierał jednak genu *cfr* kodującego metylotransferazę RNA ani genów *vgaA, vgaAv* i *lsaC*, które warunkują łączną oporność na pleuromutyliny, linkozamidy i streptograminy A u bakterii Gram-dodatnich (van Duijkern i wsp. 2014). Jedynie u 10 (8 *L. salivarius* i 2 *L. ingluviei*) z 79 izolatów *Lactobacillus* zakwalifikowanych jako fenotypowo oporne na tiamulinę (MIC≥64 μg/ml) potwierdziłam obecność genu *lsaE* kodującego transporter ABC. Determinanta ta została wcześniej opisana dla gronkowców, enterokoków oraz *Streptococcus agalactie* (Si i wsp. 2015). Genowi *lsaE* w większości przypadków towarzyszyła obecność genów *ant(6')-Ia* i *aadE,* co znajduje poparcie w wynikach innych autorów wskazujących na występowanie u bakterii fermentacji mlekowej plazmidów lub klasterów chromosomalnych zawierających kilka genów oporności, w tym trzy wymienione wyżej (Si i wsp. 2015).

Zaobserwowałam, że występowanie pewnych genów oporności jest skorelowane z gatunkiem *Lactobacillus*. Geny *tetL* i *tetM* występujące przeważnie w koegzystencji i identyfikowane z wysoką częstotliwością u *L. salivarius* (26% izolatów *tetL* i/lub *tetM* pozytywnych) nie zostały wykryte u żadnego z izolatów *L. johnsonii, L. saerimneri* czy *L. reuteri*. Z kolei obecności genu *tetW* nie potwierdziłam u żadnego izolatu z gatunku

L. salivarius i *L. agilis*, natomiast występował on powszechnie u opornych na tetracyklinę izolatów z grupy *L. delbruckii* (*L. johnsonii, L. crispatus*) i *L. reuteri (L. reuteri, L. oris, L. ingluviei)*. Geny *lsaE, ant(6')-Ia* i *aadE* występowały tylko u izolatów *L. salivarius* i *L. ingluviei*.

W przeciwieństwie do praktyk stosowanych przez wielu autorów, w analizie molekularnej ujęłam wszystkie izolaty, a nie tylko te, które odznaczały się opornością fenotypową. Dzięki takiej strategii wykazałam, że występowanie niektórych genów oporności nie musi być związane z manifestacją oporności fenotypowej. Obserwacje te dotyczą przede wszystkim genu *ermC* i *cat*. Pierwszy z ich koduje metylazę, która modyfikuje miejsce uchwytu makrolidów (23S rRNA), drugi acetylotranferazę chloramfenikolową, która przekształca cząsteczki leku do nieaktywnej formy diacetylu chloramfenikolu (Cauwerts i wsp. 2006b, Hummel i wsp. 2017). Obecność genu *ermC* wykryłam u 6 (16%) z 37 izolatów opornych na makrolidy i u 4 (8%) izolatów wrażliwych. Gen *cat* został zidentyfikowany u 40% izolatów cechujących się fenotypową opornością na chloramfenikol i u 37% izolatów zakwalifikowanych jako wrażliwe. Występowanie genów *ermC* i *cat* u pałeczek *Lactobacillus* fenotypowo wrażliwych wykazali także inni autorzy (Cauwerts i wsp. 2006b, Hummel i wsp. 2007). U pojedynczych izolatów *Lactobacillus* obserwowałam również występowanie innych genów oporności (*lnuA, aac(6')-Ie-aph(2')-Ia, aph(2")-Ic, ant(6)-Ia, aadE*) przy jednoczesnym braku opornego fenotypu. Przyczyną tego zjawiska mogą być zaburzenia ekspresji genów pojawiające się np. na skutek mutacji w genach regulatorowych (Hummel i wsp. 2007).

Podczas przeprowadzonych badań nie udało się wyjaśnić mechanizmu oporności lactobacilli na penicyliny, ale dzięki zastosowaniu testu z nitrocefiną wykazałam, że nie jest on związany z wytwarzaniem przez bakterie β-laktamaz (nie wykryto genu *blaZ*).

Podsumowując badania dotyczące antybiotykowrażliwości lactobacilli należy podkreślić, że prezentowane w publikacji 3 i 6 dane są źródłem cennych informacji na temat występowania szczepów antybiotykoopornych i genów oporności wśród bakterii niechorobotwórczych mikroflory jelitowej zwierząt hodowlanych w Polsce. Odnotowana powszechna lekooporność lactobacilli, szczególnie u izolatów pochodzących od kur, wskazuje na potrzebę promowania racjonalnego stosowania antybiotyków w hodowli drobiu. Większy nacisk należy położyć na terapie alternatywne i wdrażanie praktyk bioasekuracji, które są najskuteczniejszym, najtańszym i najbezpieczniejszym sposobem zapobiegania rozprzestrzenianiu się chorób na fermach drobiu. Wskazana wydaje się także zmiana przepisów regulujących stosowanie antybiotyków u zwierząt. Obecność wielu z wykrytych u lactobacilli genów oporności została wcześniej potwierdzona na ruchomych elementach genetycznych,

które mogą być w łatwy sposób przekazywane do innych bakterii kolonizujących przewód pokarmowy gospodarza i rozprzestrzeniać się w środowisku (Devirgiliis i wsp. 2013). Zjawisko to może przyczyniać się do rozwoju opornych na antybiotyki patogenów, które stwarzają ryzyko wystąpienia infekcji trudnych do zwalczenia zarówno u drobiu, jak i u konsumentów.

VI. Podsumowanie

Prace wchodzące w skład omawianego osiągnięcia naukowego są źródłem cennych informacji dotyczących bioróżnorodności, metod hodowli i identyfikacji, właściwości probiotycznych oraz antybiotykowrażliwości pałeczek *Lactobacillus* występujących u drobiu w Polsce. Uzyskane wyniki są unikatowe w kontekście badań krajowych i stanowią istotne uzupełnienie danych z tego zakresu opisanych przez innych autorów na świecie. Badania mają charakter nie tylko poznawczy ale i aplikacyjny.

Podczas realizacji projektu

- dokonałam oceny zróżnicowania gatunkowego lactobacilli występujących u gęsi i kur w Polsce; na podkreślenie zasługuje fakt, że opublikowane przez mnie prace są jedynymi w literaturze światowej dotyczącymi pałeczek *Lactobacillus* od gęsi;
- zaobserwowałam, że beztlenowe warunki hodowli nie są niezbędne do wzrostu wyizolowanych lactobacilli; bakterie te można namnażać w atmosferze 5% CO_2 co pozwala na obniżenie kosztów badań i czyni je łatwiejszymi w wykonaniu;
- dostosowałam istniejące protokoły izolacji DNA do pałeczek *Lactobacillus*; opracowana metodologia usuwania grubej ściany komórkowej tych bakterii pozwoliła na ekstrakcję znacznych ilości DNA o wysokiej czystości;
- opracowałam protokoły identyfikacji gatunkowej pałeczek *Lactobacillus* przy wykorzystaniu takich technik jak spektrometria masowa typu MALDI-TOF, analiza restrykcyjna 16S rDNA oraz analiza sekwencji 16S-23S rDNA; wykazałam, że w przypadku techniki SM MALDI-TOF identyfikacja lactobacilli możliwa jest za pomocą metody bezpośredniej i pośredniej z ekstrakcją białek komórkowych bakterii na płytce; odstąpienie od dodatkowego, standardowo stosowanego przy identyfikacji drobnoustrojów etapu ekstrakcji frakcji białkowych skraca czas badania i obniża jego koszty; zaproponowane przeze mnie metody genotypowania są stosukowo proste, powtarzalne i możliwe do

wykonania w każdym laboratorium biologii molekularnej; stanowią alternatywę dla identyfikacji bakterii opartej na sekwencjonowaniu DNA, które wymaga zakupu kosztownego sprzętu (sekwenatora DNA) bądź korzystania z usług laboratoriów zewnętrznych;

- oceniłam potencjał probiotyczy lactobacilli występujących u drobiu i wykazałam, że wiele z przebadanych izolatów odznacza się silnym antagonizmem wobec bakteryjnych patogenów drobiu, hydrofobowością, tolerancją na niskie pH i sole żółci, a niektóre także zdolnością do tworzenia biofilmu; jednak nie wszystkie lactobacilli cechujące się tymi właściwościami probiotycznymi mogą bez zastrzeżeń znaleźć zastosowanie w żywieniu zwierząt ze względu na przekroczone normy antybiotykowrażliwości; dla fenotypowo opornych izolatów *Lactobacillus* można przeprowadzić dokładniejsze testy genetyczne w celu ustalenia, czy oporność na dany antybiotyk jest spowodowana mutacją genomową (dopuszczalne przez EFSA) czy dodaniem egzogennego DNA (niedopuszczalne przez EFSA); w przypadku oporności zakodowanej na plazmidach możliwe jest również usunięcie z komórek bakteryjnych mobilnych elementów genetycznych na drodze tworzenia protoplastów (tzw. *plasmid curing*) (Rosander i wsp. 2008);
- wyselekcjonowałam kilkadziesiąt izolatów *Lactobacillus* (48 izolatów od gęsi i 11 izolatów od kur), które spełniają kryteria stawiane przez EFSA mikrobiologicznym dodatkom paszowym w zakresie antybiotykowrażliwości i jednocześnie odznaczają się innymi cechami probiotycznymi; izolaty te mogą posłużyć do opracowania komercyjnego preparatu probiotycznego przeznaczonego dla drobiu; określenie ich skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania wymaga przeprowadzenia dalszych badań na modelach zwierzęcych;
- wykazałam korelację pomiędzy pewnymi cechami fenotypowymi (aktywność przeciwbakteryjna, wytwarzanie H_2O_2, tolerancja na sole żółci) i genotypowymi (występowanie niektórych genów oporności) a gatunkiem *Lactobacillus*;
- określiłam wrażliwości lactobacilli na szereg antybiotyków i chemioterapeutyków i wykazałam, że naturalna mikroflora jelitowa drobiu hodowanego w Polsce jest rezerwuarem antybiotykoopornych szczepów *Lactobacillus* i genów oporności; opublikowane prace są pierwszymi doniesieniami nt. wrażliwości lactobacilli na tiamulinę i flumechinę i potwierdzającymi występowania genu *lsaE* w tym rodzaju bakterii; przedstawione badania są także źródłem danych (wartości MIC) dla komitetów

i instytucji kompetentnych w zakresie ustanawiania norm antybiotykowrażliwości drobnoustrojów.

VII. Piśmiennictwo

1. Aasen IM, Møretrø T, Katla T, Axelsson L, Storrø I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, 53:159-66.
2. Abbas Hilmi HT, Surakka A, Apajalahti J, Saris PE. Identification of the most abundant *Lactobacillus* species in the crop of 1- and 5-week-old broiler chickens. Appl Environ Microbiol 2007, 73:7867-73.
3. Burkholder KM, Thompson KL, Einstein ME, Applegate TJ, Patterson JA. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers. *Poult Sci* 2008, 87:1734-41.
4. Cauwerts K, Pasmans F, Devriese LA, Haesebrouck F, Decostere A. Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers often display resistance toward tetracycline antibiotics. *Microb Drug Resist* 2006a, 12:284-8.
5. Cauwerts K, Pasmans F, Devriese LA, Martel A, Haesebrouck F, Decostere A. Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers show high prevalence of resistance towards macrolide and lincosamide antibiotics. *Avian Pathol* 2006b, 35:160-4.
6. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 2007, 69:330-9.
7. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001, 65:232-60.
8. Clemens ET, Stevens CE, Southworth M. Sites of organic acid production and pattern of digesta movement in the gastrointestinal tract of geese. *J Nutr* 1975, 105:1341-50.
9. Cornejo J, Lapierre L, Iragüen D, Cornejo S, Cassus G, Richter P, San Martín B. Study of enrofloxacin and flumequine residues depletion in eggs of laying hens after oral administration. *J Vet Pharmacol Ther* 2012, 35:67-72.
10. Devirgiliis C, Zinno P, Perozzi G. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Front Microbiol* 2013, 4:301.
11. EFSA 2011. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal* 2011, 9:2105.
12. EFSA 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* 2012, 10:2740.
13. EFSA 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015, 13:3991.
14. EFSA 2018. EFSA Panel BIOHAZ Statement. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 7: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2017. *EFSA Journal* 2018, 16:5131.
15. Ehrmann MA, Kurzak P, Bauer J, Vogel RF. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol* 2002, 92:966-75.
16. FAO/WHO 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada April 30 and May 1, 2002.

17. Ganan M, Martinez-Rodriguez AJ, Carrascosa AV, Vesterlund S, Salminen S, Satokari R. 2013. Interaction of *Campylobacter* spp. And human probiotics in chicken intestinal mucus. *Zoonoses Public Health* 2013, 60: 141-8.

18. Garriga M, Pascual M, Monfort JM, Hugas M. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J Appl Microbiol* 1998, 84:125-32.

19. Grover S, Kumar A, Srivastava AK, Batish VK. Probiotics as functional food ingredients for augmenting human health; w: Ghosh D, Das S, Bagchi D, Smarta RB, *Innovation in healthy and functional foods*, CRC Press Taylor & Francis Group 2013, 396-7.

20. Hummel AS, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CM. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73:730-9.

21. Jaimee G, Halami PM. Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin-an impending menace. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016, 100:1137-51.

22. Jin LZ, Y. Ho YW, Abdullah N, Ali MA, Jalaludin S. Antagonistic effect of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Lett Appl Microbiol* 1996, 23:67-71.

23. Kizerwetter-Świda M, Binek M. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Pol J Microbiol* 2005, 54:287-94.

24. Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G, Hildebrandt B, Müller-Bertling S, Witte W, Goossens H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus, Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother* 2007, 59:900-12.

25. Kmet V, Piatnicová E. Antibiotic resistance in commensal intestinal microflora. *Folia Microbiol* (Praha) 2010, 55:332-5.

26. Kos B, Susković J, Vuković S, Simpraga M, Frece J, Matosić S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 2003, 94:981-7.

27. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, 72:728-64.

28. Liguori AP, Warrington SD, Ginther JL, Pearson T, Bowers J, Glass MB, Mayo M, Wuthiekanun V, Engelthaler D, Peacock SJ, Currie BJ, Wagner DM, Keim P, Tuanyok A. Diversity of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) reveals phylogenetic relationships in Burkholderia pseudomallei and its nar.-neighbors. *PLoS One* 2011, 6:e29323.

29. Lutful Kabir SM. The role of probiotics in the poultry industry. Int J Mol Sci 2009 12, 10: 3531-46.

30. Lutful Kabir. Avian colibacilliosis and salmonellosis: a close look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and publick health concerns. *Int J Environ Res Public Health* 2010, 7:89-114.

31. Mayrhofer S, Zitz U, Birru FH, Gollan D, Gołoś AK, Kneifel W, Domig KJ. Comparison of the CLSI guideline and ISO/IDF standard for antimicrobial susceptibility testing of lactobacilli. *Microb Drug Resist* 2014, 20:591-603.

32. Mitchell NM, Johnson JR, Johnston B, Curtiss R 3rd, Mellata M. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Appl Environ Microbiol* 2015, 81:1177-87.

33. M'Sadeq SA, Wu S, Swick RA, Choct M. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-outworldwide. *Anim Nutr* 2015, 1:1-11.

34. Nazef L, Belguesmia Y, Tani A, Prévost H, Drider D. Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. *Poult Sci* 2008, 87:329-34.

35. Neal-McKinne JM, Lu X, Duong T, Larson CL, Call DR, Shah DH, Konkel ME. Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS One* 2012, 7: e43928.

36. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis* 2009, 15:300-10.

37. Ouwehand A, Vesterlund S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria; w: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.* New York: CRC Press 2004, 375-97.

38. Park YH, Hamidon F, Rajangan C, Soh KP, Gan CY, Lim TS, Abdullah WN, Liong MT. Application of probiotics for the production of safe and high-quality poultry meat. *Korean J Food Sci Anim Resour* 2016, 36:567-76.

39. Polak-Berecka M, Waśko A, Kostoń D. Comparision of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales UMCS* 2009, 64:15-24.

40. Przeniosło-Siwczyńska, Kwiatek. Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu? *Życie Weterynaryjne* 2013, 88:104-8.

41. Radwan, Skrzydło-Radomańska. Rola mikroflory jelitowej w zdrowiu i chorobie. *Gastroenetrologia Praktyczna* 2013, 5:42-52.

42. Rosander A, Connolly E , Roos S. Removal of antibiotic resistance gene carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17939. *Appl. Environ. Microbiol* 2008, 74:6032-40.

43. Salas-Jara MJ, Iiabaca A, Vega M, Garci A. Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms* 2016, 4:35.

44. Schjørring S, Krogfelt KA. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. *Int J Microbiol* 2011, 2011:1-10.

45. Shao Y, Zhang W, Guo H, Pan L, Zhang H, Sun T. Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* 2015, 50:250-8.

46. Shazali N, Foo HL, Loh TC, Choe DW, Abdul Rahim R. Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia. *Gut Pathog* 2014, 6:1.

47. Shewale RN, Sawale PD, Khedkar CD, Singh A. Selection criteria for probiotics: a review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 2014, 9:17-22.

48. Si H, Zhang WJ, Chu S, Wang XM, Dai L, Hua X, Dong Z, Schwarz S, Liu S. Novel plasmid-borne multidrug resistance gene cluster including *lsa*(E) from a linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolate of swine origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59:7113–6.

49. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification anddiagnosis. *Front Microbiol* 2015, 6:791.

50. Sip A. Bacteriocin production by lactic acid bacteria. *Biotechnologia* 1999, 2:145-65.

51. Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Liu CX, Kato H, Watanabe K. Identification of *Lactobacillus* species of human origin by a commercial kit, API50CHL. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi.* 1999, 10:77-82.

52. Stephenson DP, Moore RJ, Allison GE. *Lactobacillus* strain ecology and persistence within broiler chickens fed different diets: identification of persistent strains. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76:6494-503.

53. Svihus B. Function of the digestive system. *The Journal of Applied Poultry Research* 2014, 23: 306-14.

54. Śliżewska K., Biernasiak J., Libudzisz Z. Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, Chemia spożywcza i Biotechnologia* 2006, 984:79-91.
55. Taheri HR, Moravej H, Tabandeh F, Zaghari M, Shivazad M. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poult Sci* 2009, 88:1586-93.
56. Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Ng J, Munro K, Alatossava T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65:4264-7.
57. Wang G, Zhao Y, Tian F, Jin X, Chen H, Liu X, Zhang Q, Zhao J, Chen Y, Zhang H, Chen W. Screening of adhesive lactobacilli with antagonistic activity against *Campylobacter jejuni*. *Food Control* 2014, 44: 49–57.
58. Van Duijkeren E, Greko C, Pringle M, Baptiste KE, Catry B, Jukes H, Moreno MA, Pomba MC, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K. Pleuromutilins: use in foodproducing animals in the European Union, development of resistance and impact on human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 2014, 69:2022-31.
59. Vidanarachchi JK, Mikkelsen LL, Iji PA, Choct M. Molecular characterisation of lactobacilli isolated from ileal and caecal digesta of broilers fed with prebiotic plant extracts. *Tropical Agricultural Research* 2007, 19:46-51.
60. Zhang H, Cai Y. Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice. Wyd. Springer 2014, 1-101.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Mój dorobek naukowy nie wchodzący w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego liczy 35 publikacji, w tym 26 prac eksperymentalnych i 1 praca przeglądowa opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz 8 artykułów w czasopismach nie posiadających współczynnika wpływu (IF) lub w monografiach (Zał. 3, pkt IIA i IID). Jestem także współautorką 31 komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych (Zał. 4, pkt IIIB).

Poza pracami dotyczącymi pałeczek *Lactobacillus* brałam także czynny udział w realizacji innych badań naukowych prowadzonych w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków. Główne kierunki tych badań obejmują takie zagadnienia jak:

a) charakterystyka konglutyniny bydlęcej jako elementu odporności wrodzonej bydła,
b) prewencja, diagnostyka i charakterystyka czynników etiologicznych wywołujących zakażenia układu oddechowego u bydła,
c) alternatywne metody kontrolowania infekcji u zwierząt,
d) antybiotykowrażliwość, czynniki wirulencji i genotypowanie drobnoustrojów izolowanych od zwierząt hodowlanych i wolno żyjących.

a) Przed uzyskaniem stopnia doktora moje zainteresowania naukowe skupiały się przede wszystkim na zagadnieniach z zakresu immunologii bydła. Moja praca doktorska dotyczyła konglutyniny – surowiczego białka z grupy kolektyn zaangażowanych w odporność nieswoistą. Na podkreślenie zasługuje unikatowy w skali światowej charakter podjętych badań. Poza naszą Jednostką badania dotyczące konglutyniny były prowadzone jeszcze tylko w Dani w latach 90, pod przewodnictwem prof. Holmskov'a z Uniwersytetu w Odensie (Dania). Podczas realizacji pracy doktorskiej opracowałam chromatograficzną metodę izolacji konglutyniny z surowicy bydła (we współpracy z ww. zespołem duńskim), przedstawiłam charakterystykę elektroforetyczną tego białka, oszacowałam jego zakres występowania u zwierząt (dotychczas uważano, że występuje ono tylko u bydła), a także oceniłam wybrane funkcje biologiczne tej kolektyny. Realizacja pracy doktorskiej pozwoliła mi na praktyczne zapoznanie się z różnymi technikami badawczymi, tj. chromatografia cieczowa, elektroforeza białek, immunoblotting, cytometria przepływowa czy mikroskopia konfokalna i zdobycie nowych umiejętności laboratoryjnych. W trakcie badań pozyskałam przeciwciała poliklonalne przeciwko konglutyninie bydlęcej (na drodze immunizacji królika oczyszczoną konglutyniną); zostały one wykorzystane w immunoblottingu do detekcji konglutyniny w mleku bydła i w wyodrębnionych przez mnie surowiczych frakcjach lektynowych od różnych zwierząt oraz w testach ELISA. Zastosowane przez mnie układy chromatografii powinowactwa i chromatografii jonowymiennej do oczyszczania konglutyniny z surowicy bydła pozwoliły na uzyskanie białka o wysokim stopniu czystości. W badaniach *in vitro* wykazałam, że konglutynina połączona z resztami cukrowymi (wiązanie zależne od Ca^{2+}) stymuluje aktywność leukocytów bydlęcych wyrażającą się wzmożoną produkcją reaktywnych form tlenu ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) oraz ułatwia fagocytozę drobnoustrojów na drodze ich opsonizacji. Obecność konglutyniny wykryłam (za pomocą metody Western blotting) nie tylko w surowicy dorosłych osobników bydła (ras mlecznych i mięsnych), ale także w siarze i surowicy płodowej tych zwierząt. Istnieje zatem przypuszczenie, że białko to odgrywa ważną rolę w odporności nieswoistej noworodków. Obecność lektyn o antygenowości podobnej do konglutyniny wykazałam w surowicy u różnych przeżuwaczy, tj. u żubrów, owiec, kóz, antylop, lam, a wśród zwierząt nieprzeżuwających u świni. Moje zainteresowania naukowe kolektynami i przeprowadzone badania zaowocowały napisaniem dysertacji naukowej oraz 4 prac oryginalnych i 1 pracy przeglądowej:

- **Dec M**, Wernicki A., 2006: **Conglutinin, CL-43 and CL-46 - three bovine collectins.** *Polish Journal of Veterinary Sciences* 9: 265-75,

- **Dec M.**, Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R., Grąz M., 2012**: Purification and electrophoretic characterization of bovine conglutinin.** *Biomedical Chromatography* 26: 684-690,
- **Dec M.**, Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R., 2011: **Conglutinin is not specific to cattle.** *Veterinarni Medicina* 56: 510-519,
- **Dec M.**, Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R., Waśko A., 2012: **The effect of conglutinin on production of reactive oxygen species in bovine granulocytes.** *Journal of Veterinary Science* 13: 33-38,
- **Dec M.**, Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R., Radej S., 2012: **Effect of conglutinin on phagocytic activity of bovine granulocytes.** *Polish Journal of Veterinary Sciences* 15: 455-462.

b) Kolejny projekt naukowy, w którym brałam udział dotyczył prewencji, diagnostyki i charakterystyki czynników wywołujących zakażenia układu oddechowego u bydła. Syndrom oddechowy określany również jako enzootyczna bronchopneumonia cieląt stanowi jeden z głównych problemów zdrowotnych w produkcji zwierzęcej w kraju oraz na świecie. Proces chorobowy ma złożoną etiologię i wywoływany jest zarówno przez wirusy, tj. bydlęcy syncytialny wirus oddechowy (BRSV), wirus parainfluenzy 3 (PI-3), wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVD-MD), herpeswirus bydła (BHV-1) oraz koronawirusy jak i przez bakterie, m.in.: *Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida* i mykoplazmy. Straty ekonomiczne spowodowane występowaniem infekcji i związanymi z nią upadkami, osłabionymi przyrostami masy ciała cieląt, słabszym wykorzystaniem paszy i kosztami terapii są ogromne. Badania naszego zespołu prowadzone pod kierownictwem Pani prof. dr hab. Renaty Urban-Chmiel wykazały, że jednym z podstawowych czynników usposabiających do zachorowań zwierząt, obok predyspozycji gatunkowych oraz czynników zakaźnych (wirusy, bakterie), jest stres, szczególnie związany z transportem. Stres upośledza mechanizmy odpornościowe u zwierząt i sprawia, że stają się one podatne na infekcje układu oddechowego. U cieląt po transporcie zaobserwowaliśmy nie tylko zwiększoną zachorowalność, ale także osłabiony apetyt (mniejsze zużycie paszy), mniejsze przyrosty wagi ciała, podwyższone stężenie białek ostrej fazy oraz reaktywnych form tlenu w surowicy, a także obniżony poziom przeciwciał IgM:

- Wernicki A., Urban-Chmiel R., Puchalski A., **Dec M**., 2014: **Evaluation of the influence of transport and adaptation stress on chosen immune and oxidative parameters and occurrence of respiratory syndrome in feedlot calves.** *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 58: 111-116

Narażenie na sytuacje stresogenne, takich jak transport, objawia się u cieląt wzrostem poziomu kortyzolu we krwi (hormon stresu) oraz wystąpieniem stresu oksydacyjnego. Brak równowagi pomiędzy obecnością reaktywnych form tlenu a biologiczną zdolnością do ich szybkiej detoksykacji jest powiązane ściśle z częstością wystąpienia syndromu oddechowego u cieląt. Stad też, jedno z naszych zadań badawczych dotyczyło oceny wpływu antyoksydantów, tj. witaminy E i C, na rozwój procesu zapalnego oraz na wybrane mechanizmy obronne przeciwko infekcjom wywoływanym przez *M. haemolytica*. W publikacjach:

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Puchalski A., **Dec M.,** 2009: ***In vitro* effect of α-tocopherol and ascorbic acid supplementation on selected immunological indicators in bovine leukocytes following transportation.** *Acta Veterinaria Brno* 78: 589-594,
- Urban-Chmiel R., P. Hola P., Lisiecka U., Wernicki A., Puchalski A., **Dec M.**, Wysocka M., 2011: **An evaluation of the effects of α-tocopherol and ascorbic acid in bovine respiratory disease complex occurring in feedlot calves after transport.** *Livestock Science* 141: 53-58

wykazaliśmy, że witaminy C i E wpływają korzystnie na funkcje leukocytów bydlęcych uczestniczących w reakcjach obronnych na zakażenia układu oddechowego. Zarówno komórki hodowane *in vitro* z dodatkiem witaminy C lub E jak i leukocyty pochodzące od cieląt, u których stosowano suplementację tymi witaminami, odznaczały się zwiększoną opornością na cytotoksyczne działanie leukotoksyny wytwarzanej przez *M. haemolytica*. Ponadto, zaobserwowaliśmy stymulujące działanie witamin C i E na aktywność chemotaktyczną leukocytów oraz ich redukujący wpływ na ekspresję adhezyjnych receptorów β2-integrynowych, z którymi wiąże się leukotoksyna. Suplementacja witaminami obniżała także u cieląt stężenie wybranych białek ostrej fazy (haptoglobina, surowiczy amyloid A).

W prowadzonych aktualnie programach profilaktyki infekcji układu oddechowego bydła, poza eliminacją czynników usposabiających wykorzystuje się immunoprofilaktykę swoistą oraz metafilaktykę. Niestety, postępowanie immunoprofilaktyczne w przypadku syndromu oddechowego, który jest schorzeniem o wieloczynnikowym charakterze, jest złożone a efekty nie zawsze zadowalające. Dostępne szczepionki nie zapewniają pełnej ochrony przed zachorowaniem, a uzyskiwana odpowiedź immunologiczna jest krótkotrwała. Z tego względu w kolejnym zadaniu badawczym dotyczącym omawianego projektu naukowego skoncentrowaliśmy się na metafilaktyce polegającą na podawaniu zwierzętom niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz antybiotyków jeszcze przed pojawieniem się objawów chorobowych. We wstępnych badaniach *in vitro* nie

stwierdziliśmy istotnego wpływu megluminianu fluniksyny (niesterydowy lek przeciwzapalny) na żywotność limfocytów bydlęcych przy jednoczesnym zahamowaniu aktywności chemotaktycznej tych komórek oraz obniżeniu żywotności neutrofilów i monocytów:

- Wernicki A., Urban-Chmiel R., Puchalski A., **Dec M.**, Stęgierska D., Dudzic A., 2015: **Evaluation of the *in vitro* effect of different concentrations of flunixin on leukocytes obtained from cattle of various ages.** *Veterinarija ir Zootechnika* 72: 37-44.

Kolejne badania na modelach zwierzęcych dowiodły, że podawanie cielętom fluniksyny florfenikolu w połączeniu z suplementacją witaminami C i E redukuje u nich zachorowalność na syndrom oddechowy, a także hamuje aktywność chemotaktyczną leukocytów, ekspresję receptorów B2-integrynowych i zwiększa odporność tych komórek na działanie leukotoksyny *M. haemolytica*. Ponadto, zastosowana metafilaktyka zapobiegała u bydła stresowi oksydacyjnemu (obniżone stężenie reaktywnych form tlenu w surowicy) i reakcjom zapalnym (obniżone stężenie białek ostrej fazy).

- Urban-Chmiel R., Stachura R., Hola P., Puchalski A., **Dec M.**, Wernicki A., 2015: **Effects of flunixin and florfenicol combined with vitamins E and/or C on selected immune mechanisms in cattle under conditions of adaptive stress.** *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 59: 295-301.
- Wernicki A., Stachura R., Hola P., Puchalski A., **Dec M.**, Stęgierska D., Żurek A., Urban-Chmiel R., 2018: **Efficacy of florfenicol and flunixin followed with vitamin E and/or C on selected oxidative and inflammatory mechanisms in young cattle under transport and adaptation stress.** *Medycyna Weterynaryjna* 74: 266-271.

Badania przeprowadzone w ostatnim czasie przez nasz zespół wykazały że nie tylko fluniksyna, florfenikol i witaminy C i E, ale również antybiotyki z grupy makrolidów mają istotny wpływ na funkcje leukocytów bydlęcych. Spośród użytych w badaniu *in vitro* antybiotyków (tylozyna, tylmikozyna, roksytromycyna) roksytromycyna wywoływała najsilniejsze działania hamujące aktywność metaboliczną i chemotaktyczną leukocytów:

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Lisiecka U., Puchalski A., **Dec M**., Stęgierska D., Kurek Ł., 2017: **The effect of selected macrolides on the properties of bovine leukocytes.** *Veterinarski Arhiv* 87: 571-584.

Uczestniczyłam także w realizacji projektu dotyczącego diagnostyki zakażeń wirusowych układu oddechowego u bydła. Badania te były prowadzone we współpracy naszej Jednostki z PIW-PIB w Puławach. Dzięki ich realizacji możliwe było oszacowanie występowania w stadach bydła w Polsce takich wirusów jak BRSV, BHV-

1 oraz BVDV. Do diagnostyki infekcji wykorzystaliśmy testy PCR oparte na detekcji materiału genetycznego wirusów w próbkach biologicznych od bydła, szybkie testy paskowe oraz testy ELISA służące do wykrywania swoistych przeciwciał lub antygenów czynników zakaźnych. Występowanie syncytialnego wirusa oddechowego (BRSV) potwierdziliśmy w 60% stadach cieląt w wieku 6-12 m-cy, a wirus BHV-1 został wykryty zarówno u osobników z objawami ze strony układu oddechowego jak i u zwierząt nie wykazujących symptomów choroby. Wysoki odsetek osobników BRSV- i BHV-1-pozytywnych wskazuje na konieczność implementacji strategii mających na celu redukcje infekcji i podwyższenie produktywności na fermach krów mlecznych. Natomiast infekcje BVDV, dzięki wdrożonym programom immunoprofilaktyki, nie stanowią istotnego problemu w Polsce – detekcję wirusa odnotowaliśmy tylko w ok. 9% stad bydła. Jednak ze względu na ciężki przebieg choroby i szybką transmisję wirusa należy regularnie monitorować występowanie BVDV. Realizacja wyżej opisanego projektu zaowocowała następującymi publikacjami:

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Puchalski A., **Dec M.**, Stęgierska D., Grooms D.L., Barbu N.I., 2015: **Detection of bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy and beef cattle in Poland.** *Veterinary Quarterly* 28: 1-4.
- Wernicki A., Urban-Chmiel R., Rola J., Socha W., Stęgierska D., **Dec M.**, Puchalski A., 2015: **Prevalence of bovine herpes virus type 1 in small herds of young beef cattle in south-eastern Poland – a preliminary study.** *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 59: 467–472.
- Wernicki A, Urban-Chmiel R., Stęgierska D., Adaszek Ł., Kalinowski M., Puchalski A., **Dec M.**, 2015: **Detection of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in young beef cattle in estern and south-estern regions of Poland.** *Polish Journal of Veterinary Sciences* 18: 141-146.

Dzięki opracowaniu namnażania wirusa BRSV w hodowlach *in vitro* wykazaliśmy, że charakteryzuje się on adaptacją do infekcji także innych linii komórkowych niż pierwotne i wtórne kultury komórek tchawicy bydła:

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Majer-Dziedzic B., Gnat S., Puchalski A., **Dec M.,** 2014: **Use of different cell lines for *in vitro* cultures of bovine respiratory syncytial virus.** *Journal of Virological Methods* 204: 62-64.

W ramach badań dotyczących chorób układu oddechowego u bydła brałam także udział w realizacji zadania dotyczącego identyfikacji bakterii *M. haemolytica* i analizy wybranych bakteryjnych elementów komórkowych *Pasteurella multocida*, które mogą być zaangażowane w patogenezę zakażeń. Nasz zespół badawczy pod przewodnictwem dr Andrzeja Puchalskiego wykazał, że spektrometria masowa typu MALDI-TOF może

być z powodzeniem stosowana do szybkiej identyfikacji gatunkowej *M. haemolytica*. Dokonaliśmy także charakterystyki elektroforetycznej białek błony zewnętrznej *P. multocida* serotype A3 wytwarzanych w odpowiedzi na niedobory żelaza w środowisku:

- Puchalski A., Urban-Chmiel R., **Dec M.,** Stęgierska D., Wernicki A., 2016. **The use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of *Mannheimia haemolytica*.** *Journal of Veterinary Medical Science* 78: 1339-42.
- Puchalski A., **Dec M.,** Wernicki A., Urban-Chmiel R., Gieral A., 2010: **Characterization of outer membrane proteins participating in iron transport in *Pasteurella multocida* serotype A3.** *Polish Journal of Veterinary Sciences* 13: 121-127.

We wcześniejszych latach uczestniczyłam w realizacji podobnego zadania badawczego dotyczącego analizy białek błony zewnętrznej transportujących żelazo u szczepów *Salmonella* Enteritidis izolowanych od ludzi i drobiu:

- Puchalski A., Kolasa A., **Dec M**., Urban-Chmiel R., Kowalczyk-Pecka D., 2008: **Electrophoretic characterization of outer membrane proteins of *Salmonella* Enteritidis strains grown in diversified conditions and the estimation of their antigenic properties.** *Medycyna Weterynaryjna* 64: 193-196.

Brałam także czynny udział w badaniach dotyczące charakterystyki elektroforetycznej białek szoku cieplnego wytwarzanych zarówno w komórkach eukariotycznych jak i bakteryjnych izolowanych od bydła. Wykazaliśmy, że w odpowiedzi na podwyższoną temperaturę leukocyty bydlęce wytwarzają białko Hsp70, które może być markerem świadczącym o adaptacji organizmu do warunków stresu cieplnego. Podobna odpowiedź w postaci białka Hsp70 generowana jest przez bakterie *E. coli* inkubowane w podwyższonej temperaturze (41,5°C). Występowanie Hsp70 potwierdziliśmy w różnych frakcjach komórkowych (cytoplazmatycznej, peryplazmatycznej i błonowej) co świadczy o silnej adaptacji bakterii do niekorzystnych warunków środowiskowych i może to mieć istotne znaczenie dla organizmu kolonizowanego przez pałeczki okrężnicy:

- Urban-Chmiel R., Puchalski A., Wernicki A., **Dec M.**, Paluch E., 2009: **Characterization of Hsp70 proteins in bovine leukocytes induced by the temperature 41°C.** *Polish Journal of Veterinary Sciences* 12: 323-328.
- Urban-Chmiel R., **Dec M.,** Puchalski A., Wernicki A., 2013: **Characterization of heat-shock prpteins in *Escherichia coli* strains under thermal stress *in vitro.*** *Journal of Medical Microbiology* 62: 1897-1901.

c) Działania naukowe prowadzone w ostatnich latach w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej skoncentrowane są na alternatywnych metodach zwalczania infekcji u zwierząt. Równolegle z realizowanym przez mnie projektem dotyczącym probiotycznych właściwości pałeczek *Lactobacillus* prowadzone są badania z zakresu charakterystyki bakteriofagów i ich potencjalnego zastosowania w zwalczaniu infekcji u zwierząt. W pracy z 2015 r. opublikowanej w czasopiśmie PloS One

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Stęgierska D., **Dec M.**, Dudzic A., Puchalski A., 2015: **Isolation and characterization of lytic properties of bacteriophages specific for *M. haemolytica* strains.** *PLoS One* 10: e0140140

nasz zespół przedstawił charakterystykę morfologiczną i genetyczną bakteriofagów łagodnych swoistych dla *M. haemolytica*. Większość z pozyskanych fagów działała litycznie na bakterie izolowane z przypadków klinicznych od bydła. Za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazaliśmy, że fagi te mają zróżnicowaną morfologię i należą do trzech różnych grup taksonomicznych. W pracy

- Urban-Chmiel R., Wernicki A., Wawrzykowski J., Puchalski A., Nowaczek A., **Dec M.**, Stęgierska D., Alomari MMM., 2018: **Isolation and characterization of lytic properties of bacteriophages specific for *M. haemolytica* strains.** *AMB Express* 8:102

przedstawiliśmy profile białkowe fagów przynależnych do rodziny *Myovirdae* indukowanych w komórkach *M. haemolytica*; frakcje białkowe zostały rozdzielone w elektroforezie dwukierunkowej i poddane analizie w technice spektrometrii masowej typu MALDI-TOF. W najbliższej przyszłości planowane są dalsze badania mające na dopracowanie metodyki pozyskiwania fagów i ich praktycznego wykorzystania w leczeniu syndromu oddechowego u bydła.

W ramach zrealizowanej w Zakładzie Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków anglojęzycznej pracy doktorskiej prowadzone były badania nad izolacją i charakterystyką bakteriofagów swoistych dla shigatoksycznych szczepów *E. coli* izolowanych od bydła. Bakterie te z reguły nie wywołują infekcji u zwierząt, ale są bardzo niebezpiecznymi patogenami ludzi. Dlatego jedna ze strategii ochrony zdrowia publicznego polega na zwalczaniu shigatoksycznych *E. coli* u bydła, które jest głównym rezerwuarem zarazka. Przeprowadzone badania wykazały, że fagi wyizolowane z próbek środowiskowych wykazują swoistość względem shigatoksycznych izolatów *E. coli* i jako fagi lityczne mogą mieć zastosowanie kliniczne.

- Alomari M.M.M., Nowaczek A., **Dec M.**, Urban-Chmiel R., 2016: **Antibacterial activity of bacteriophages isolated from poultry against Shiga-toxic strains of *Escherichia coli* isolated from calves.** *Medycyna Weterynaryjna* 72: 699-703.

Na podkreślenie zasługuje fakt opracowania przez nasz zespół badawczy preparatu bakteriofagowo-probiotycznego, który ma postać czopków doodbytniczych dla bydła. W eksperymencie na grupie cieląt potwierdziliśmy jego prewencyjne i terapeutyczne działanie polegające na redukowaniu biegunek u cieląt oraz podwyższeniu statusu immunologicznego zwierząt. Zgłoszenie patentowe (nr P.424314) dotyczące ww. wynalazku aktualnie podlega procesowi ewaluacji w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej.

Na etapie recenzji edytorskich w czasopiśmie z listy JCR jest także praca, w której nasz zespół przedstawił charakterystykę morfologiczną i genetyczną bakteriofagów swoistych dla szczepów *Campylobacter* spp. izolowanych od kurcząt broilerów:

- Nowaczek A. Urban-Chmiel R., **Dec M.**, Puchalski A., Stepień-Pyśniak D., Marek A., Pyzik E: **Characterization of bacteriophages specific for *Campylobacter* spp. isolated from the gut of broiler chickens.**

Poza bakteriofagami i probiotykami alternatywą dla terapii antybiotykowej u zwierząt mogą być także nanocząstki metali takich jak srebro, złoto, miedź i platyna. Badania naszego zespołu wykazały, że komercyjne preparaty zawierające te metale mogą być skuteczne w zwalczaniu zakażeń gruczołu mlekowego u bydła. Najsilniejszą aktywnością bójczą wobec bakterii (*E. coli, S. uberis, S. aureus*) i drożdży (*C. albicans, C. krusei*) izolowanych z przypadków mastitis odznaczały się nanocząstki srebra i miedzi:

- Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R., **Dec M.**, Stęgierska D., Dudzic A., Wójcik A., 2014: **Antimicrobial properties of gold, silver, copper and platinum nanoparticles against selected microorganisms isolated from cases of mastitis in cattle.** *Medycyna Weterynaryjna* 70: 564-567.

Efektem moich zainteresowań naukowych dotyczących alternatywnych metod zwalczania infekcji u zwierząt jest także praca przeglądowa dotycząca możliwości wykorzystania IFN alfa w profilaktyce i terapii. W przeciwieństwie do stosowanych u ludzi wysokich iniekcyjnych dawek tej cytokiny podawanie jej bezpośrednio na błonę śluzową nosa i gardła w niskich stężeniach naśladujących naturalne wytwarzanie w organizmie nie wiążę się z występowaniem skutków ubocznych i ma dodatni wpływ na przyrosty masy ciała zwierząt.

- **Dec M**., Puchalski A., 2008: **Use of oromucosally administered interferon-alpha in the prevention and treatment of animal diseases.** *Polish Journal of Veterinary Sciences* 11: 175-86.

d) W ostatnim czasie biorę czynny udział w badaniach dotyczących oceny antybiotykowrażliwości, wirulencji i genotypowania różnych grup bakterii izolowanych od zwierząt hodowlanych i dziko żyjących. Problematyka oporności drobnoustrojów obejmuje szeroką tematykę badawczą. Za względu na duże prawdopodobieństwo transmisji szczepów lekoopornych pomiędzy zwierzętami hodowlanymi a człowiekiem, te pierwsze, w ostatnich latach, stały się obiektem intensywnego monitoringu w zakresie antybiotykowrażliwości kolonizujących je bakterii. Poza oznaczaniem antybiotykowrażliwości fenotypowej prowadzę badania dotyczące analizy genotypowych profili oporności oraz doskonalenia laboratoryjnych metod oznaczania lekooporności. Badania naszego zespołu z wykorzystaniem materiału pochodzącego z różnych źródeł wskazują, że zwierzęta hodowlane jak i dziko żyjące są rezerwuarem drobnoustrojów lekoopornych i dotyczy to zarówno bakterii niepatogennych (lactobacilli) jak i potencjalnie chorobotwórczych i chorobotwórczych (*Campylobacter, Enterococcus, E. coli*). Wykazaliśmy, że gołębie hodowlane oraz dziko żyjące są nosicielami bakterii *Campylobacter* spp. (gł. *C. jejuni*), a zebrane izolaty odznaczały się wysoką częstotliwością występowania oporności na antybiotyki powszechnie stosowane w leczeniu ludzi i zwierząt (makrolidy, streptomycynę, teracykliny i penicyliny):

- Dudzic A., Urban-Chmiel R., Stępień-Pyśniak D., **Dec M.**, Puchalski A., Wernicki A., 2016: **Isolation, identification and antibiotic resistance of *Campylobacter* strains isolated from domestic and free-living pigeons.** *British Poultry Science* 57: 172-178.

Jestem zaangażowana także w realizację projektu dotyczącego antybiotykowrażliwości i charakterystyki genotypowej bakterii z rodzaju *Enterococcus* izolowanych od ptaków dziko żyjących. Dotychczasowe badania wykazały, że u tych zwierząt powszechnie występują lekooporne szczepy *E. faecalis, E. faecium* oraz enterococci należące do innych gatunków, a dzięki zastosowaniu elektroforezy pulsacyjnej oraz sekwencjonowania wybranych genów metabolizmu zaszeregowaliśmy zebrane izolaty do różnych pulsotypów i typów sekwencyjnych, w tym kilku dotąd nieopisanych. U wyizolowanych enterococci potwierdziliśmy także występowanie czynników wirulencji. Efektem naszych badań są trzy publikacje:

- Stępień-Pyśniak D., Hauschild T, Nowaczek A, Marek A, **Dec M.**, 2018. **Wild Birds as a Potential Source of Known and Novel Multilocus Sequence Types of Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis.*** *Journal of Wildlife Diseases* 54:219-228,
- Stępień-Pyśniak D., Hauschild T, Kosikowska U., **Dec M.**, Urban-Chmiel R. **Phenotypic properties associate with the pathology and distribution of virulence genes among**

enterococcal isolates from wild birds in Poland (praca jest na etapie recenzji naukowych w czasopiśmie z listy JCR),

- Stępień-Pyśniak D., Hauschild T, **Dec M.**, Marek A., Urban-Chmiel R. **Clonal structure and antibiotic resistance of *Enterococcus faecium, Enterococcus hirae, Enterococcus durans*, and *Enterococcus casseliflavus* from wild birds in Poland** (praca jest na etapie recenzji naukowych w czasopiśmie z listy JCR).

Aktualnie realizuję także projekt naukowy we współpracy z naukowcami z Uniwersytetu w Pizie, Włochy. Dotyczy on oceny występowania oraz charakterystyki fenotypowej i genotypowej bakterii chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych (*E. coli* i *Enterococcus* sp.) izolowanych od zwierząt dziko żyjących. Przeprowadzone badania pokazały, że ssaki (wilki, łasicowate, muflony, listy, dziki, borsuki) zamieszkujące Park Aupan Alps we Włoszech mogą być nosicielami groźnych szczepów bakterii *Enterococcus* spp. i *E. coli* zawierających geny kodujące oporność na antybiotyki oraz czynniki wirulencji (potwierdziliśmy obecność wieloopornych patogennych szczepów E. *faecalis* oraz shigatoksycznych szczepów *E. coli*). Owocem współpracy są aktualnie dwie prace, a których jedna (dotycząca *E. coli*) uzyskała pozytywne recenzje w czasopiśmie *Microbial Drug Resistance*, a druga (dotycząca enterococci) jest w końcowej fazie przygotowania:

- Turchi B., **Dec M.**, Bertelloni F., Winiarczyk S., Gnat S., Bresciani F., Viviani F., Cerri D., Fratini F. **Antibiotic susceptibility and virulence factors in *E. coli* from sympatric wildlife of Apuan Alps Regional Park (Tuscany, Italy).**

Aktualnie jestem także głównym wykonawcą projektu dotyczącego oceny antybiotykowrażliwości i wirulencji bakterii *E. coli* i *Enterococcus* spp. występujących u gadów.

W przypadku wszystkich grup zwierząt materiał badawczy stanowiły wymazy z kloaki lub próbki kału. Obecne w nich drobnoustroje, w tym szczepy zawierające geny lekooporności i/lub wirulencji, mogą w łatwy sposób ulegać rozprzestrzenianiu w środowisku i kolonizować organizmy innych zwierząt lub ludzi. Szczególne zagrożenie stanowią wielooporne szczepy chorobotwórcze, które mogą wywoływać infekcje trudne do zwalczenia. Ze względu na znaczenie zoonotyczne wyizolowanych bakterii, badania w tym zakresie są nadal kontynuowane i poszerzane o kolejne gatunki i grupy badanych zwierząt.

Plany naukowe na przyszłość

W przyszłości planuję kontynuację badań nad bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* i ich poszerzenie o inne gatunki ptaków oraz ssaki i gady. Aktualnie realizuję projekt dotyczący charakterystyki pałeczek *Lactobacillus* występujących u indyków domowych. Jest on finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 1. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań zabrałam dane nt. identyfikacji, wybranych cech biochemicznych oraz antybiotykowrażliwości lactobacilli wyizolowanych od indyków. Wyniki przedstawiłam w pracy pt. „Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys", która uzyskała pozytywne recenzje w czasopiśmie *BMC Microbiology* (IF_{2017}=2,829). Jednocześnie opracowuję protokoły metody PCR MP (Melting Profile) do wewnątrzgatunkowego typowania lactobacilli. Poszczególne genotypy mogą być skorelowane z określonymi cechami fenotypowymi drobnoustroju, z gatunkiem gospodarza lub rejonem geograficznym. Technika PCR MP oparta o ligację adaptorów oligonukleotydowych i różnice w temperaturach topnienia fragmentów restrykcyjnych DNA jest alternatywą dla skomplikowanej w wykonaniu i wymagającej posiadania spcejalistycznego sprzętu metody PFGE (pulse-field gel electrophoresis).

W najbliższym planuję także złożenie do Urzędu Patentowego Rzeczpospolitej Polskiej wniosku o udzielenie patentu na nowe szczepy bakteryjne. Zgłoszenie będzie dotyczyło izolatów *Lactobacillus* wyizolowanych od drobiu i spełniających kryteria dla mikrobiologicznych dodatków paszowych.

Podjęłam także działania zmierzające do komercjalizacji preparatu probiotycznego wykorzystującego wyselekcjonowane przez mnie izolaty *Lactobacillus.* Przeprowadziłam w tej sprawie wstępną rozmowę z przedstawicielem jednej z największych firm drobiarskich w Polsce, która jest zainteresowana podniesieniem wydajności produkcji poprzez zastosowanie probiotyków. Pierwszym krokiem współpracy będą badania na modelach zwierzęcych. Jednocześnie planowane jest poszukiwanie nowych probiotycznych szczepów *Lactobacillus* na drodze izolacji ich od drobiu z gospodarstw przydomowych.

Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- współautorstwo w 42 publikacjach, w tym w 33 pracach oryginalnych i 1 pracy przeglądowej opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz w 8 artykułach w czasopismach spoza tej listy lub w monografiach; w 13 publikacjach jestem pierwszym autorem (Zał. 3 I.b, II.A i II.D),
- współautorstwo w 31 komunikatach zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych; aktywny udział w 13 konferencjach naukowych, a tym w jednej zagranicznej jako zaproszony prelegent i członek Komitetu Naukowego (Zał. 4 III.B i III.C),
- sumaryczny Impact Factor wszystkich opublikowanych prac wynosi 36,928, a liczba punktów wg MNiSW 809; indeks Hirscha - 6; liczba cytowań wg bazy Scopus wynosi 137, wg bazy Web of Science 115, a bez autocytowań 85,
- opieka w charakterze promotora pomocniczego anglojęzycznej pracy doktorskiej; promotorstwo 10 prac inżynierskich i 2 magisterskich (Zał. 4 III.I i III.K),
- wykonanie recenzji 12 manuskryptów prac dla redakcji kilkunastu czasopism naukowych oraz 3 prac magisterskich i 1 pracy inżynierskiej (Zał. 4 III.P i III.Q),
- kierowanie jednym projektem NCN (w ramach konkursu Miniatura 1) i czterokrotnie grantami dla młodych naukowców przyznanymi przez Prorektora UP w Lublinie ds. Nauki, Wdrożeń i Współpracy z Zagranicą; udział jako wykonawca w jednym zrealizowanym projekcie badawczym finansowanym przez MNiI (Zał. 3 II.I),
- odbyty 6 tygodniowy staż naukowy na Uniwersytecie w Pizie (Włochy) oraz cztery staże tygodniowe na uniwersytetach w Kordobie (Hiszpania), Bursie (Turcja), Gandawie (Belgia) i w Stambule (Turcja) (Zał.4 III.L),
- współpraca z ośrodkiem naukowym w Pizie, Włochy.

Zestawienie liczbowe dorobku naukowego z uwzględnieniem punktacji MNiSW oraz współczynnika wpływu (Impact Factor, IF)

	Przed uzyskaniem stopnia doktora			**Po uzyskaniu stopnia doktora**		
	Liczka publikacji	**Punktacja MNiSW**	**IF**	**Liczka publikacji**	**Punktacja MNiSW**	**IF**
Czasopisma z listy JCR Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe				7	195	12,623
Czasopisma z listy JCR Publikacje oryginalne	3	55	1,345	23	500	22,495
Czasopisma z listy JCR Publikacje przeglądowe	1	10	0,465			
Pozostałe czasopisma Publikacje oryginalne	1	10	–	1	10	–
Pozostałe czasopisma Publikacje przeglądowe	1	6	–	1	3	–
Rozdziały w monografiach				4	20*	–
Łącznie	6	81	1,810	36	728	35,118
Łączna liczba publikacji	**42**					
Łączny IF	**36,928**					
Łączna liczba punktów MNiSW	**809**					
Komunikaty zjazdowe Konferencje krajowe	6	–	–	18	–	–
Komunikaty zjazdowe Konferencje międzynarodowe	–	–	–	7	–	–
	6			**25**		
Łącznie liczba komunikatów	**31**					

* Punktacja rozdziału w monografii naukowej wieloautorskiej wg Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 12 grudnia 2016 r. w sprawie przyznawania kategorii naukowej jednostkom naukowym i uczelniom, w których zgodnie z ich statutami nie wyodrębniono podstawowych jednostek organizacyjnych, Dz. U. poz. 2154.

B) Działalność dydaktyczna

Począwszy od 2004 r. do chwili obecnej prowadzę zajęcia dydaktyczne na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej dla studentów kierunku Weterynaria oraz na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie dla studentów Biotechnologii. Na kierunku Weterynaria realizuję ćwiczenia z Immunologii (II rok) i Higieny środków żywienia zwierząt (III rok); ze studentami Biotechnologii – ćwiczenia z Immunologii (III rok) oraz ćwiczenia i wykłady z przedmiotów Biotechnologia w diagnostyce i leczeniu zwierząt (III rok, blok: Technologiczne aspekty biotechnologii) i Zarys biotechnologii w leczeniu zwierząt (III rok, blok:

Biologiczne aspekty biotechnologii); w przypadku dwóch ostatnich jestem osobą odpowiedzialną za realizację przedmiotu.

W latach 2015-2017 prowadziłam seminaria dla słuchaczy anglojęzycznych studiów doktoranckich (Zał. 4 III.I). Realizowałam także zajęcia dydaktyczne w języku angielskim (łącznie 20 godzin) dla studentów kierunku Weterynaria oraz Nauka i Technologia w Produkcji Zwierzęcej, a także dla doktorantów na kilku uczelniach zagranicznych, tj. Istanbul University (2018 r.), University of Pisa (2017 r.), Uludag University (2012 r.), University of Cordoba (2011 r.) (Zał. 4 III.I). W 2018 r. uczestniczyłam jako członek Komitetu Naukowego i zaproszony prelegent w międzynarodowym naukowym kongresie studentów medycyny weterynaryjnej (20th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress) w Stambule (3-5 maj 2018 r.)

Kilkukrotnie byłam kierownikiem projektów prezentowanych w ramach Lubelskiego Festiwalu Nauki; w 2009 r. wygłosiłam wykład podczas Seminarium Koła Naukowego Biotechnologów „BIOM" UP w Lublinie (Zał. 4 III.I).

W latach 2015-2018 sprawowałam opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego anglojęzycznej pracy doktorskiej (Zał. 4 III.K). Jestem promotorem 2 prac magisterskich oraz 10 prac inżynierskich studentów kierunku Biotechnologia (Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie) (Zał. 4 III.I).

Jestem członkiem rady programowej nowo powstającego kierunku studiów Analityka weterynaryjna na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie.

Pełny wykaz opublikowanych przez mnie prac naukowych znajduje się w Załączniku nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Szczegółowe informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy z instytucjami i organizacjami, odbytych stażach naukowych oraz działalności popularyzującej naukę przedstawiłam w Załączniku nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Lublin, dn. 13.09.2018 r.

Marta Dec