

Puławy, 26.05.2020 r.

dr hab. Jolanta G. Rola, prof. instytutu
Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego
Państwowy Instytut Weterynaryjny –
Państwowy Instytut Badawczy
Al. Partyzantów 57
24-100 Puławy

Ocena

osiągnięć naukowo-badawczych oraz całokształtu dorobku dydaktycznego
i popularyzatorskiego

dr n. wet. inż. Ewy Wałęckiej-Zacharskiej,
ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria

Recenzję przygotowano w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego na podstawie wniosku do Rady Doskonałości Naukowej z dnia 17.12.2019 r. o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria i powołaniem na recenzenta na podstawie pisma z dnia 28.02.2020 (Z4.4000.6.2019.3.AS).

Ocena formalna

Otrzymane dokumenty są dobrze przygotowanym i wystarczającym materiałem do dokonania analizy dorobku naukowego w postępowaniu habilitacyjnym. Spełniają one wymogi formalne określone w art. 221 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.).

Podstawowe informacje o Habilitantce

Dr n. wet. inż. Ewa Wałęcka-Zacharska ukończyła w 2006 r. studia na Wydziale Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu otrzymując tytuł inżyniera, a w 2008 r. tytuł magistra biotechnologii. Następnie podjęła studia doktoranckie w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, gdzie w 2012 r. uzyskała stopień doktora nauk

weterynaryjnych na podstawie rozprawy „Badanie wpływu stresu środowiskowego na wirulencję *Listeria monocytogenes*”. Z macierzystą uczelnią związała swoje życie zawodowe, w latach 2011 – 2013 jako asystent, a następnie, od 2014 r. do dnia dzisiejszego jako adiunkt.

Ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy dr inż. Ewy Wałęckiej-Zacharskiej obejmuje 41 pozycji, w tym cztery prace wskazane jako osiągnięcie naukowe będące podstawą wszczęcia postępowania habilitacyjnego. Habilitantka jest autorem lub współautorem 28 publikacji oryginalnych z listy JCR, w tym 20 publikacji po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych (dwie przeglądowe i 18 badawczych), jednej pracy popularnonaukowej i jednego rozdziału w monografii oraz 11 doniesień (dwa ustne i 9 plakatowych) prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych.

Dorobek naukowy dr Wałęckiej-Zacharskiej jest znaczący pod względem jakościowym, o czym świadczą wskaźniki bibliometryczne. Podany przez Habilitantkę sumaryczny Impact Factor całego dorobku naukowego wynosi 62,183. Liczba punktów według klasyfikacji MNiSW wynosi 995. Z pozostałych wskaźników wymienić należy: index cytowań według bazy Web of Science = 174 (162 bez autocytowań), według bazy Scopus 179 (bez autocytowań 168) i index Hirscha według obu baz = 7.

Ocena cyklu publikacji wskazanego jako osiągnięcie naukowe będące podstawą wszczęcia postępowania habilitacyjnego

Dr inż. Ewa Wałęcka-Zacharska przedstawiła do oceny cykl czterech prac oryginalnych pod wspólnym tytułem „**Badania molekularnych podstaw inwazyjności *L. monocytogenes* i jej zmian indukowanych stresem środowiskowym**”. Prace te są opracowaniami wieloautorskimi, we wszystkich Habilitantka jest pierwszym autorem. Wkład dr Wałęckiej-Zacharskiej w ich powstanie jest znaczny i obejmuje zarówno opracowanie koncepcji badań i metodyki, przeprowadzenie badań lub ich części, analizę i interpretację wyników jak i przygotowanie manuskryptu. Wiodącą rolę Habilitantki w ich powstaniu potwierdzają oświadczenia współautorów prac zamieszczone w dokumentacji przedstawionej do oceny.

Na oceniane osiągnięcie naukowe składają się następujące publikacje:

P1) Wałęcka-Zacharska E, Kosek-Paszkowska K, Bania J, Karpíšková R, Stefaniak T. Salt stress-induced invasiveness of major *Listeria monocytogenes* serotypes. *Lett Appl Microbiol* 2013, 56, 216-221 (MNiSW 20, IF 1,622).

P2) Walecka-Zacharska E, Kosek-Paszkowska K, Bania J, Staroniewicz Z, Bednarski M, Wieliczko A. Invasiveness of *L. monocytogenes* strains isolated from animals in Poland. *Pol J Vet Sci* 2015, 18, 697-702 (MNiSW **20**, IF **0,719**).

P3) Walecka-Zacharska E, Gmyrek R, Skowron K, Kosek-Paszkowska K, Bania J. Duration of heat stress effect on invasiveness of *L. monocytogenes* strains. *BioMed Res Int* 2018, 1457480 (MNiSW **25**, IF **2,197**).

P4) Walecka-Zacharska E, Korkus J, Skowron K, Wietlicka-Piszc M, Kosek-Paszkowska K, Bania J. Effect of temperatures used in food storage on duration of heat stress induced invasiveness of *L. monocytogenes*. *Microorganisms* 2019, 7, 467 (MNiSW **20**, IF **4,167**).

Łączna wartość współczynnika *Impact factor* w roku opublikowania prac wynosi **8,705** i **85** punktów według listy czasopism punktowanych MNiSW.

Listeria monocytogenes jest jednym z najważniejszych patogenów przenoszonych przez żywność i pomimo prawnie gwarantowanego nadzoru nad produkcją żywności i jej obrotem, w dalszym ciągu stanowi zagrożenie dla zdrowia publicznego. W procesie produkcji żywności bakterie narażone są na wiele niekorzystnych czynników, takich jak wysokie stężenie soli, niskie pH, niskie lub wysokie temperatury. Poddane stresowi zmieniają swój metabolizm, co ułatwia im przetrwanie w niekorzystnych warunkach.

Celem naukowym osiągnięcia było:

- określenie zakresu zmian inwazyjności w odpowiedzi na stres w grupie szczepów reprezentujących zasadnicze grupy genetyczne oraz najważniejsze serotypy *L. monocytogenes*,
- zbadanie ekspresji najważniejszych internalin w odpowiedzi na wybrane rodzaje stresu w szczepach *L. monocytogenes*,
- analizę polimorfizmu sekwencji białek InlA i InlB w szczepach *L. monocytogenes* różniących się zdolnością do wnikania do ludzkich komórek raka okrężnicy,
- określenie czasu utrzymywania się zmian inwazyjności wywołanych stresem w warunkach optymalnych dla wzrostu *L. monocytogenes* i w warunkach spotykanych w trakcie przechowywania żywności.

Omówienie przez Habilitantkę przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników poprzedza wprowadzenie, które jest kompleksową, obszerną analizą problemu występowania listeriozy u ludzi związanej ze spożyciem żywności zanieczyszczonej *L. monocytogenes*. Dr Wałęcka-Zacharska charakteryzuje drobnoustroj, przedstawia objawy kliniczne i konsekwencje zakażenia (wysoka śmiertelność), opisuje zdolność przetrwania drobnoustroju w niekorzystnych warunkach środowiskowych oraz możliwości zmian wirulencji. Przedstawia także zalety i wady metod stosowanych do badania chorobotwórczości szczepów *L. monocytogenes*, w tym testy *in vivo* i *in vitro*.

W pierwszej prezentowanej w cyklu pracy (**P1**) Habilitantka zajmuje się problemem zakresu zmian inwazyjności w odpowiedzi na stres osmotyczny wśród szczepów *L. monocytogenes*. Przeprowadzone badania wykazują, że szczepy *L. monocytogenes* 4b są najbardziej chorobotwórcze wśród najważniejszych serotypów *L. monocytogenes* i w najwyższym stopniu zwiększają inwazyjność w odpowiedzi na stres osmotyczny.

W kolejnej pracy (**P2**) dr Wałęcka-Zacharska podjęła próbę wyjaśnienia molekularnego podłoża różnic w inwazyjności szczepów *L. monocytogenes* wyosobnionych od zwierząt. W swoich badaniach wykazała bardzo duże zróżnicowanie szczepów *L. monocytogenes* pod względem zdolności do wnikania do komórek linii ludzkiego nabłonka. Zidentyfikowała 44 polimorfizmy sekwencji białka InlB. Ponadto, w szczepach o znikomej zdolności do wnikania do komórek ludzkiego nabłonka stwierdziła trzy unikalne, nieopisane wcześniej polimorfizmy InlB.

Porównanie wyników przedstawionych w publikacji **P1** i **P2** nasunęły Habilitantce wnioski, że szczepy o znikomym potencjale inwazyjnym występują częściej u zwierząt, niż w środowisku klinicznym oraz w żywności.

Planując dalsze doświadczenia dotyczące wirulencji *L. monocytogenes*, dr Wałęcka-Zacharska starała się odtworzyć warunki temperaturowe przewodu pokarmowego człowieka a także warunki chłodniczego przechowywania żywności.

W publikacjach **P3** i **P4** Habilitantka zajęła się zagadnieniem utrzymywania się u bakterii zmian inwazyjności indukowanych stresem jakim jest obróbka termiczna.

W publikacji **P3** określiła długość utrzymywania się efektu stresu cieplnego na inwazyjność szczepów *L. monocytogenes* utrzymywanych po zadziałaniu stresu w temperaturze 37°C. Wstrząs cieplny znacząco obniżył inwazyjność wszystkich bakterii. Inkubując uprzednio poddane działaniu stresu bakterie w temperaturze 37°C dr Wałęcka-Zacharska stwierdziła, że efekt stresu w postaci obniżenia inwazyjności utrzymywał się od kilkunastu do 72 godzin w zależności od szczepu. Wykazała, że przynależność do grupy

genetycznej, serotyp i źródło pochodzenia szczepów nie mają związku z długością trwania efektu stresu. Aby wyjaśnić molekularne podłoże obserwowanych zmian inwazyjności szczepów zbadano ekspresję genów wirulencji *inlAB*, *prfA* oraz genu odpowiedzi na stres *sigB*. Dowiedziono, że wzrost inwazyjności korelował ze wzrostem poziomu transkryptów *inlAB*. Nie stwierdzono jednak związku między spadkiem inwazyjności i poziomem tych transkryptów oraz między poziomem ekspresji *prfA* i *sigB*, a inwazyjnością.

Następnie, w publikacji **P4** dr Wałęcka-Zacharska skupiła się na badaniach wpływu temperatury przechowywania żywności na długość utrzymywania się zmian inwazyjności *L. monocytogenes* poddanej obróbce cieplnej. Stwierdziła, że ogrzewanie znacząco obniżyło inwazyjność bakterii w porównaniu z bakteriami kontrolnymi. Spadek inwazyjności utrzymywał się średnio trzy dni u bakterii inkubowanych po zadziałaniu stresu w temperaturze 5°C, a 7 dni w temperaturze 20°C. Niezależnie od temperatury, w której utrzymywano bakterie po działaniu stresu, po 7 dniach inwazyjność bakterii rosła, osiągając wartość inwazyjności bakterii kontrolnych. Co więcej, po dwóch tygodniach inkubacji zarówno w 5°C jak i w 20°C inwazyjność bakterii ogrzewanych była istotnie wyższa od inwazyjności bakterii kontrolnych.

W podsumowaniu osiągnięcia naukowego Habilitantka jasno i precyzyjnie przedstawiła rezultaty swoich badań i przedstawiła główne wnioski.

Reasumując, stwierdzam, że oceniany jednotematyczny cykl publikacji stanowi oryginalne opracowanie o dużym znaczeniu poznawczym, będące istotnym wkładem dr Wałęckiej-Zacharskiej w rozwój dziedziny nauk rolniczych w dyscyplinie naukowej z zakresu weterynarii. Badania dr Wałęckiej-Zacharskiej umożliwiają rozpoznanie zmian wirulencji *L. monocytogenes* i przybliżają możliwość rozwiązywania problemów związanych z produkcją i przechowywaniem żywności z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności.

Ocena pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Dr inż. Ewa Wałęcka-Zacharska posiada znaczny dorobek naukowo-badawczy, biorąc pod uwagę niezbyt długi, bo liczący 12 lat staż pracy łącznie z okresem studiów doktoranckich.

Jak sama deklaruje jej zainteresowania badawcze związane są z mikrobiologią żywności ale prowadzone przez nią badania obejmują także zagadnienia takie jak:

- zróżnicowanie genetyczne oraz występowanie czynników wirulencji w populacji szpitalnych szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Zastosowaną metodą genotypowania było MLVA. Oznaczono także obecność genów hemolizyny, lipazy,

genu *esp* kodującego czynnik wiązany ze zdolnością do tworzenia biofilmu oraz genów oporności na wankomycynę.

- rozwój metod identyfikacji gatunkowej w produktach żywności pochodzenia zwierzęcego. Opracowano metodę ilościowego określania zawartości mleka krowiego w mleku kozim do wykrywania zafałszowania mleka opartą o metodę PCR w czasie rzeczywistym. Metodę zastosowano w latach 2005-2009 do monitorowania jakości koziego mleka UHT.

Wyniki tych prac zostały przedstawione w 4 publikacjach (**P5, P6, P7, P8 i P9**), umieszczonych w wykazie osiągnięć naukowych.

Działalność naukowa dr inż. Ewy Wałeckiej-Zacharskiej, która zaowocowała rozprawą doktorską, związana była z określeniem wpływu stresu środowiskowego na inwazyjność *Listeria monocytogenes*. Badania zogniskowano na roli gęstości populacji, stresie cieplnym i osmotycznym. Wpływ stresu określano w teście tworzenia lysinek na linii komórek ludzkiego raka okrężnicy. Badania inwazyjności przeprowadzone na bakteriach w różnych fazach wzrostu wykazały, iż przejściu bakterii z fazy logarytmicznej do stacjonarnej towarzyszy stopniowa redukcja inwazyjności. Wydłużenie czasu poddania *L. monocytogenes* podwyższonej temperaturze zmniejsza w istotny sposób liczbę bakterii a pozostałe listerie wykazują zwiększoną inwazyjność. Jednocześnie wykazano, że krótkie czasy ekspozycji oraz niskie stężenia NaCl są wystarczające do uzyskania maksymalnych obserwowanych zmian inwazyjności *L. monocytogenes*. Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane w trzech artykułach naukowych (**P10, P12, P13**) i w rozdziale monografii anglojęzycznej (**P11**) umieszczonych w wykazie osiągnięć naukowych.

Po uzyskaniu stopnia doktora Habilitantka, oprócz działalności naukowej, której wyniki zebrane zostały w ocenianym osiągnięciu habilitacyjnym, koncentrowała się na występowaniu, oporności na antybiotyki i środki dezynfekcyjne oraz wirulencji *L. monocytogenes*. Przeprowadzone badania miały na celu ocenę występowania *L. monocytogenes* w środowisku produkcji żywności, charakterystykę genotypową izolatów, określenie zdolności tworzenia biofilmu, a także ocenę lekooporności oraz wrażliwości na środki dezynfekcyjne. Efektem prowadzonych badań i owocnej współpracy z zespołem dr hab. Krzysztofa Skowrona z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy jest siedem publikacji w uznanych czasopismach zagranicznych (**P17, P18, P19, P20, P21, P22 i P23**) przedstawionych w wykazie osiągnięć naukowych.

Dr inż. Ewa Wałęcka-Zacharska uczestniczyła także w realizacji takich tematów badawczych jak:

- badanie roli alternatywnego transkryptu IL-1 β w rozwoju niewydolności serca u psów;
- oznaczanie częstości występowania wirusa BVD u bydła;
- analiza częstości występowania szczepów *Arcobacter butzleri* i *Arcobacter cryaerophilus* w mięsie i charakterystyka genotypowa szczepów;
- badanie oddziaływania ekstraktów chmielu, flawonoidów i ich pochodnych na wybrane patogenne mikroorganizmy;
- badania nad rolą fosforybozylotransferazy w niespecyficznym zapaleniu jelita;
- badania nad skutecznością promieniowej jonizacji katalitycznej w eliminacji pałeczek *Klebsiella pneumoniae* NDM.

Wyniki tej aktywności badawczej zostały opublikowane w siedmiu publikacjach (**P14, P24, P25, P26, P27, P28 i P29**) ujętych w wykazie osiągnięć naukowych.

Podsumowując tą część dokumentacji uważam, że dorobek naukowy dr inż. Ewy Wałęckiej-Zacharskiej jest bardzo wartościowy pod względem naukowym i spełnia wymagania stawiane osobom ubiegającym się o stopień naukowy doktora habilitowanego.

Ocena dorobku dydaktycznego, popularyzatorskiego oraz współpracy międzynarodowej

Na szczególną uwagę zasługuje także doświadczenie dydaktyczne, umiejętności analityczne i efektywna, szeroka współpraca z pracownikami innych ośrodków naukowych.

Habilitantka prowadziła zajęcia w języku polskim i angielskim z „Higieny mięsa i zwierząt rzeźnych” oraz „Bezpieczeństwa pasz” ze studentami Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz przeprowadziła szkolenie z zakresu technik PCR dla uczestników projektu Erasmus+ AgLab z Mołdawii i Ukrainy. Wykłada także w swojej dziedzinie na specjalistycznym studium podyplomowym „Higiena Zwierząt Rzeźnych i Żywności Zwierzęcego Pochodzenia” na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Dr Wałęcka-Zacharska w latach 2016-2019 pełniła funkcję promotora 3 prac magisterskich oraz promotora pomocniczego 2 prac doktorskich zakończonych obroną. Obecnie pełni funkcję promotora pomocniczego przewodu doktorskiego wszczętego na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej macierzystej uczelni Kandydatki.

Habilitantka brała aktywny udział w realizacji trzech projektów badawczych finansowanych przez NCN jako wykonawca oraz trzykrotnie wnioskowała o finansowanie takich projektów.

Kandydatka była recenzentką 9 publikacji naukowych w uznanych czasopismach zagranicznych.

W ramach działalności popularyzatorskiej opublikowała w czasopiśmie „Życie Weterynaryjne” artykuł pt. „*Listeria monocytogenes* - patogen, który wie jak przetrwać”.

Jest także współautorem zgłoszenia patentowego WYN425328 z dnia 24.04.2018 r.

W ramach współpracy międzynarodowej brała udział w stażach naukowych, dwukrotnie w Augusta University, Gorgia, USA (2017 i 2018 r.) i w University of British Columbia, Vancouver, Kanada. Efektem współpracy i prowadzonych badań było doniesienie na konferencję ASM Microbe w Atlancie i dwie publikacje. Habilitantka podnosiła swoje kwalifikacje także w ramach staży szkoleniowych w ośrodkach zagranicznych takich jak University of Pittsburgh, Pennsylvania, USA i The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

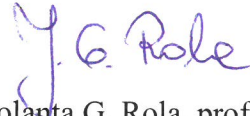
W latach 2010-2019 Habilitantka otrzymała sześć nagród I stopnia Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w dziedzinie badań naukowych (pięć zespołowych i jedną indywidualną) oraz Stypendium Fundacji na rzecz Nauki Polskiej dla Młodych uczonych START.

W latach 2016 -2019 uczestniczyła w pracach Komisji ds. informacji o działalności B+R Wydziału Medycyny Weterynaryjnej prowadząc analizę dorobku swojej Katedry do ewaluacji naukowej. Obecnie jest członkiem Komisji ds. sprawozdawczości i informacji o działalności badawczej przy Radzie Dyscypliny Weterynaria w kadencji 2019-2020.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Na podstawie analizy całokształtu dorobku naukowego, działalności dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej, a w szczególności cyklu 4 publikacji powiązanych tematycznie pod tytułem „**Badania molekularnych podstaw inwazyjności *L. monocytogenes* i jej zmian indukowanych stresem środowiskowym**” stanowiącego szczególne osiągnięcie, stwierdzam, że **dr inż. Ewa Walecka-Zacharska** spełnia bez zastrzeżeń wymogi stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2019 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2020 r. poz. 85 ze zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Komisji Habilitacyjnej o podjęcie

dalszych czynności w postępowaniu o nadanie dr inż. Ewie Wałęckiej-Zacharskiej stopnia doktora habilitowanego nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria.

Handwritten signature in blue ink, reading "J. G. Rola".

dr hab. Jolanta G. Rola, prof. instytutu

