

Olsztyn, 24.02.2026 r.

dr hab. Joanna Małaczewska, prof. UWM
Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Ewy Strzelczyk pt. „Characteristics of *Aeromonas salmonicida*, a rainbow trout pathogen, and early signatures of host immune response”

Podstawą formalną przygotowania recenzji jest decyzja Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o powołaniu recenzentów, podjęta na posiedzeniu w dniu 13 stycznia 2026 roku.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Ewy Strzelczyk przygotowana została pod opieką promotora dr hab. Marka Fola z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

W przedłożonej do oceny pracy Doktorantka podjęła się analizy porównawczej trzech, różniących się stopniem zjadliwości, wariantów szczepu JF2267 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, na poziomie genomu oraz ich interakcji z komórkami pstrąga tęczowego, odpowiedzialnymi za nieswoistą odpowiedź immunologiczną w infekcjach bakteryjnych. Ocenie został też poddany wpływ czynników środowiskowych na ekspresję genów u wysoce zjadliwego wariantu szczepu. Badany patogen jest czynnikiem etiologicznym wrzodzenia (furunkulozy) ryb łososiowatych, groźnej, ogólnoustrojowej, wysoce zaraźliwej choroby o zasięgu ogólnosiwiatowym. Choć schorzenie i wywołująca je bakteria znane są od ponad stu lat, duża plastyczność genomowa patogenu, sprzyjająca powstawaniu nowych szczepów oraz bogaty repertuar czynników zjadliwości, w które jest on wyposażony, utrudniają skuteczną kontrolę schorzenia. W związku z powyższym, bakteria wciąż jest obiektem intensywnych badań, skupiających się na bardziej dogłębnym poznaniu zarówno samego czynnika zakaźnego, jak i jego interakcji z organizmem gospodarza, a badania mgr Joanny Strzelczyk świetnie się w ten trend wpisują.

Recenzowana dysertacja ma formę 122-stronicowego manuskryptu, napisanego w języku angielskim, o układzie cokolwiek odbiegającym od standardowego. Po stronie tytułowej, spisie treści, wykazie skrótów, wstępie (8 stron) i opisie celu badań, praca została podzielona na 3 niezależne części, poświęcone odpowiednio: genomice (27 stron), transkryptomice (26 stron) i badaniom immunologicznym (26 stron). Wszystkie te części składają się z podrozdziałów o układzie typowym dla opracowań naukowych, tj. wstępu, opisu

użytych materiałów i metod, wyników i dyskusji. Manuskrypt zamykają wnioski, wniosek ogólny, streszczenie w języku angielskim i polskim, piśmiennictwo (336 pozycji), spisy ilustracji, tabel i materiałów uzupełniających. Praca zawiera 38 rycin i 15 tabel, z czego odpowiednio 25 i 11 przedstawia uzyskane wyniki. Szczegółowe dane zamieszczone zostały w materiałach uzupełniających (9 pozycji). Strona graficzna pracy została przygotowana z dużą starannością i jest niezwykle satysfakcjonująca w odbiorze. Decyzja Doktorantki o modyfikacji tradycyjnego układu pracy i jej podziale na trzy części jest w pełni uzasadniona i ułatwia odbiór pracy. Zapewne układ ten odzwierciedla również przyszły podział pracy na publikacje naukowe. Nie rozumiem jedynie umieszczenia streszczeń na końcu pracy, wszak miejsce abstraktu w opracowaniu naukowym jest na jego początku. Jest to jednak uwaga czysto edytorska i nie wpływa na ocenę dysertacji.

Pracę otwiera podzielony na podrozdziały wstęp, opatrzony podtytułem „Immunity of rainbow trout against pathogen *Aeromonas salmonicida*, its mechanisms and impact”. Rozpoczęła go Doktorantka od ogólnych informacji na temat pstrąga tęczowego i jego znaczenia w akwakulturze, charakterystyki chowu ryb w obiegu zamkniętym, jakim jest Recyrkulacyjny System Akwakultury (RAS) i czynników stresowych, związanych z intensyfikacją produkcji, a predysponujących zwierzęta do zwiększonej podatności na działanie czynników zakaźnych. W kolejnych podrozdziałach skrótowo omówiła wybrane metody kontroli schorzeń bakteryjnych ryb, jednostkę chorobową, jaką jest wrzodzienica ryb łososiowatych oraz powodujący ją patogen i jego czynniki zjadliwości. W tej części najwięcej uwagi Autorka poświęciła występującemu u patogenów Gram-ujemnych, łatwo podlegającemu rearanżacji, plazmidowo kodowanemu systemowi wydzielniczemu typu III (T3SS). Ostatni podrozdział wstępu skupia się na konieczności dokładnego poznania interakcji między patogenem, a gospodarzem dla opracowania skutecznych metod kontroli schorzenia i roli, jaką w tym zadaniu odgrywają dostępne narzędzia biotechnologiczne, stanowiąc tym samym uzasadnienie podjęcia tematu. W mojej opinii wstęp został dobrze zaplanowany, jest też niezłe napisany i łatwy w odbiorze, jednak wbrew nadanemu mu podtytułowi, próżno w nim szukać informacji o odpowiedzi immunologicznej pstrąga wobec *Aeromonas salmonicida* i jej mechanizmach. W mojej opinii również sam patogen jest interesujący z immunologicznego punktu widzenia, istnieją bowiem doniesienia na temat mechanizmów unikania (ewazji) odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Szkoda, że Doktorantka nie poświęciła choćby drobnego pasażu we wstępie temu istotnemu zagadnieniu. Mam też pewne zastrzeżenia do treści, które zostały ujęte we wstępie:

1. Autorka dwukrotnie stwierdza (str. 11 i 15), że do gatunku *Aeromonas salmonicida* zaliczono cztery podgatunki, przy czym za pierwszym razem sama wymienia ich pięć (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *achromogenes*, *masoucida*, *pectinolytica* i *smithia*), tymczasem w 2025 w taksonomii „pojawił” się szósty podgatunek: *Aeromonas salmonicida* subsp. *oncorhynchi* (Ajmi et al. 2025, DOI: 10.3390/pathogens14060523). Zdaję sobie jednak sprawę, że zmiana jest świeża i została wprowadzona raptem kilka miesięcy przed przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.
2. Lektura podrozdziału 2.1.1 „Antibiotics, probiotics and vaccines” może prowadzić do nieuprawnionego wniosku o bez troskim i nieregulowanym stosowaniu antybiotyków w europejskiej akwakulturze. Wspominając o nadużywaniu antybiotyków i

konsekwencjach takiego podejścia, Autorka używa wprawdzie czasu przeszłego, nie podaje jednak żadnych ram czasowych i nie wspomina o działaniach naprawczych. W Unii Europejskiej stosowanie antybiotyków jako stymulatorów wzrostu w akwakulturze zostało zakazane 20 lat temu, zabronione jest również ich profilaktyczne stosowanie.

W kolejnym rozdziale Doktorantka wskazała cel badań i wyznaczyła 7 celów szczegółowych. Cele zostały zidentyfikowane prawidłowo, jednak sformułowane w mało przejrzysty sposób. Badania są interesujące, szeroko zakrojone i zostały dobrze zaplanowane, a precyzyjne określenie celów uwypukliłoby ten fakt. Ujęcie celu w formie opisowej, z jednoczesnym odniesieniem do użytych metod badawczych, podobnie jak pięciolinijkowy opis pierwszego celu szczegółowego spowodowało swego rodzaju przeładowanie informacyjne, niekorzystne dla odbioru tego istotnego rozdziału. Osobiście jestem zwolenniczką bardziej standardowego podejścia, polegającego na sformułowaniu jasnych hipotez badawczych i wskazaniu celów umożliwiających ich weryfikację.

Zaplanowane przez Doktorantkę badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem bogatego warsztatu badawczego, obejmującego zarówno metody klasyczne (hodowla i analiza właściwości biochemicznych drobnoustrojów, izolacja i hodowla komórek z narządów limfatycznych ryb, mikroskopia), jak i nowoczesne (sortowanie magnetyczne komórek, cytometria przepływowa, real-time PCR, sekwencjonowanie nowej generacji, mikromacierze ekspresyjne). Analiza bioinformatyczna danych z wielkoskalowych technik pomiarowych użytych w badaniach wymagała od Doktorantki dużej wiedzy i ogromnego nakładu pracy. Metody badawcze zostały dobrze dobrane i opisane, bardzo podobają mi się też czytelne graficzne przedstawienia planów doświadczeń (Ryc. 5 i 20).

Badania zaplanowano w trzech etapach, a uzyskane wyniki i ich interpretacja zostały przedstawione w trzech oddzielnych rozdziałach (4.3, 5.3 i 6.3), zgodnie z podziałem całego manuskryptu. W pierwszej części badań Doktorantka przeprowadziła sekwencjonowanie całogenomowe badanych wariantów szczepu JF2267 i dokonała analizy porównawczej ich genomów. Jako punkt odniesienia wykorzystany został genom szczepu A449, dostępny w bazie NCBI. Genom najbardziej zjadliwego wariantu był największy i zawierał sekwencje niewystępujące u mniej zjadliwych wariantów. Chromosom wszystkich wariantów okazał się dość stabilny. To geny zawarte w dużych plazmidach 4 i 5 cechowały się plastycznością i wysokim poziomem zmienności, co wskazuje na lokalizację tutaj genów kodujących czynniki zjadliwości. Małe plazmidy kryptyczne wszystkich wariantów szczepu JF2267 miały podobną ilość genów, jak u szczepu referencyjnego. W tej części manuskryptu zabrakło, moim zdaniem, odwołania do pracy Attéré i wsp. z 2015 roku (DOI: 10.3389/fmicb.2015.01274), koncentrującej się na analizie porównawczej genomów małych plazmidów różnych szczepów *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Autorzy tej publikacji wskazali szczep JF2267, jako szczep o nietypowym repertuarze małych plazmidów, nieposiadający plazmidu kryptycznego 3 (pAsa3). Tymczasem doktorantka potwierdziła obecność tego plazmidu u wszystkich badanych wariantów szczepu JF2267. Bardzo proszę o odniesienie się do tej istotnej rozbieżności uzyskanych wyników z danymi literaturowymi. W dalszej części swoich analiz Doktorantka skoncentrowała się na porównaniu różnic w genomach, skorelowanych z poziomem wirulencji

badanych wariantów szczepu JF2267, wnioskując, że wysoce wirulentny wariant może być wyposażony w dodatkowy, szósty plazmid, nieobecny u szczepu referencyjnego.

Drugą część badań Doktorantka poświęciła analizom transkryptomu wysoce zjadliwego wariantu szczepu JF2267 (HV) hodowanego w warunkach stresu (ograniczony dostęp do żelaza, wapnia, tlenu, suboptymalna temperatura), koncentrując się na genach związanych z wirulencją i wczesnymi etapami interakcji patogenu z organizmem gospodarza. Tylko w warunkach ograniczonego dostępu do żelaza i wapnia czas generacji bakterii uległ wydłużeniu, również w tych warunkach Doktorantka zaobserwowała zmiany w ekspresji największej ilości genów. Uzyskane wyniki wskazują na złożoną naturę tego zjawiska, zmiana w obrębie pojedynczego czynnika środowiskowego regulowała bowiem ekspresję całej sieci genów. Niewątpliwie przeprowadzone badania stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych analiz. Bardzo spodobało mi się zastosowanie diagramu Woronoja, zamiast tradycyjnej mapy cieplnej, do wizualizacji uzyskanych wyników.

Trzeci etap badań Doktorantki koncentrował się na analizie porównawczej wczesnych etapów interakcji wariantów patogenu o różnym poziomie zjadliwości z komponentami układu immunologicznego pstrąga tęczowego w warunkach *in vitro* i *in vivo*. W badaniach *in vitro* ocenie zostały poddane: (1) wpływ zewnątrzkomórkowych białek bakteryjnych na erytrocyty, (2) wpływ humoralnych (surowica) i komórkowych (komórki nerki główowej) czynników odporności na wzrost bakterii oraz (3) aktywność wybuchu tlenowego limfocytów i komórek mieloidalnych nerki główowej, stymulowanych trzema wariantami szczepu JF2267. W badaniach *in vivo* Doktorantka skupiła się na ocenie ekspresji receptorów TLR w różnych populacjach komórek izolowanych z krwi i narządów/tkanek limfatycznych ryb (nerka główowa, grasica, śledziona, jelito) po eksperymentalnym zakażeniu zwierząt wariantami patogenu o różnej zjadliwości. W mojej opinii, najistotniejsze obserwacje, poczynione w toku badań immunologicznych to (1) hamowanie wybuchu tlenowego przez wysoce zjadliwy szczep, co wskazuje na jego zdolność unikania wczesnej odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego i (2) stymulacja ekspresji niektórych receptorów TLR przez ten szczep, wskazująca że ewazja nie jest wynikiem blokady zdolności komórek gospodarza do rozpoznawania wzorców molekularnych związanych z patogenem. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka przebadala szeroki panel receptorów TLR w różnych populacjach komórek, po ich wcześniejszym sortowaniu magnetycznym. Mam, niestety, kilka zastrzeżeń dotyczących tej części badań.

Uwagi krytyczne do części immunologicznej:

1. W „Materiałach i Metodach” brak informacji o zgodzie Lokalnej Komisji Etycznej na zakażenie zwierząt doświadczalnych.
2. Analiza statystyczna wpływu surowicy na wzrost bakterii (metodyka podrozdział 6.2.5, wyniki Ryc. 24). Do porównania średnich z dwóch grup należało użyć testu t-Studenta. Analiza wariancji znajduje zastosowanie w przypadku minimum trzech grup.
3. Przy cytometrycznej ocenie wybuchu tlenowego zwykle bierze się pod uwagę dwie wartości: (1) odsetek aktywnych komórek i (2) średnią intensywność fluorescencji (MFI). Pierwszy parametr został uwzględniony w podrozdziale wyniki, brak jednak drugiego, informującego o stopniu natężenia procesu w aktywnych komórkach.

4. Fagocytoza to nie to samo co wybuch tlenowy (rozdziały 6.2.7 i 6.3.4). Do oceny odsetka komórek fagocytydujących używa się innych testów, w których komórki fagocytydujące pochłaniają znakowane fluorochromem bakterie. Zwykle odsetek komórek pochłaniających bakterie jest wyższy, niż tych ulegających wybuchowi tlenowemu. Porównanie zmian w natężeniu obu procesów pod wpływem wysoce wirulentnego szczepu *A. salmonicida* mogłoby też dać odpowiedź, czy hamuje on pochłanianie bakterii i wybuch, czy tylko ten drugi.
5. Pomimo dobrze i ciekawie zaplanowanych doświadczeń wpływu bakterii na wybuch tlenowy i ekspresję receptorów TLR, ze względu na brak powtórzeń, uzyskane dane należy uznać raczej za obserwacje, niż wyniki. W immunologii nawet doświadczenia przeprowadzane *in vitro* na dobrze scharakteryzowanych liniach komórkowych powtarza się przynajmniej trzykrotnie. W przypadku doświadczeń na komórkach pierwotnych, ze względu na znaczne różnice np. w poziomie ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną u poszczególnych osobników, takie powtórzenia są konieczne tym bardziej. Ponieważ wspomniane badania Doktorantka przeprowadziła na pojedynczych lub pulowanych próbkach, niemożliwa była ocena statystyczna uzyskanych wyników. W opisie wyników nie powinny się zatem znaleźć sformułowania typu: „Compared to the control group, TLR7, TLR8a1/2, TLR9 showed significant upregulation” (strona 82 manuskryptu).

Wyniki wszystkich części badań zostały szeroko opisane i bogato zilustrowane, a dyskusja przeprowadzona w sposób wskazujący na dużą wiedzę Doktorantki w temacie. Pani mgr Joanna Strzelczyk posiłkowała się przy pisaniu rozprawy bardzo bogatym piśmiennictwem (336 pozycji), prawidłowo dobranym i posługiwała się nim z dużą wprawą. Manuskrypt kończą prawidłowo sformułowane wnioski.

Pozostałe uwagi o charakterze edytorskim:

Poniższe uwagi nie wpływają na ocenę recenzowanej dysertacji, ich uwzględnienie może jednak ułatwić doszlifowanie finalnej wersji przyszłych artykułów.

1. Lista skrótów zawiera dwa błędnie rozwinięte skróty:
 - a) FAO: w tekście jest „*Food and Aquaculture Organization*”, a powinno być „*Food and Agriculture Organization*”,
 - b) PRR: jest „*Pathogen Recognition Receptor*”, powinno być „*Pattern Recognition Receptor*”.
2. Nomenklatura:
 - a) Skrót łacińskiej nazwy podgatunku. W manuskrypcie Autorka konsekwentnie używa skrótu ssp. (*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*). Zasadniczo nie jest to błędem, w biologii znajdują zastosowanie dwa skróty na oznaczenie łacińskiej nazwy podgatunku, tj. „*subsp.*” i „*ssp.*”. W nomenklaturze bakterii preferowanym i rekomendowanym skrótem jest jednak „*subsp.*”.
 - b) Skrót łacińskiej nazwy gatunku. W informacjach na temat mikrobioty jelitowej ryb, bakterii probiotycznych i patogennych, wymieniając dominujące rodzaje Autorka używa skrótu sp. (np. *Aeromonas* sp.), podczas gdy powinna użyć skrótu spp.,

- oznaczającego liczbę mnogą/liczne gatunki w obrębie rodzaju. Skrót sp. odnosi się do pojedynczego, niezidentyfikowanego (np. nowego) gatunku z rodzaju.
3. Ujednolicenia wymaga nazewnictwo testowanych szczepów (czy może raczej wariantów, wszystkie wywodzą się bowiem od tego samego szczepu) *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. W miejscu gdzie pojawiają się po raz pierwszy (Materiały i Metody, podrozdział 4.2.1) posiadają własne oznaczenia literowo-cyfrowe, typowe dla szczepu (JF2267, JF5054 i JF3239). W dalszej części manuskryptu opisywane są już jako trzy szczepy o tym samym kodzie JF2267, z oznaczeniami definiującymi różnice w stopniu zjadliwości (WT, ATT, HV), wreszcie na rycinie 31 manuskryptu i w materiałach uzupełniających (Suplement 9) szczep o wysokiej wirulencji figuruje pod wymowną nazwą „killer”.
 4. Tabela zawierająca informacje na temat starterów użytych do oznaczenia ekspresji genów kodujących receptory TLR pstrąga tęczowego powinna znaleźć się w głównej części manuskryptu (podrozdział 6.2.8), a nie w materiałach dodatkowych.
 5. Piśmiennictwo: niekonsekwencja w podawaniu nazwisk autorów w publikacjach wieloautorских. Równolegle stosowane dwa wzory: (1) nazwisko pierwszego autora + et al. i (2) wymienione nazwiska wszystkich współautorów.

Podsumowanie i wniosek końcowy:

Badania mgr Joanny Strzelczyk są spójne, a użycie różniących się stopniem zjadliwości wariantów jednego szczepu daje lepszy wgląd w zjawisko plastyczności genomowej i ewolucji wirulencji u *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Duża ilość uwag krytycznych, zawartych w niniejszej recenzji wynika w znacznej mierze z faktu, że dysertacja nie stanowi zbioru już opublikowanych artykułów, lecz przygotowana została w formie manuskryptu, co oznacza, że nie przeszła ona wcześniejszej weryfikacji przez zewnętrznych recenzentów. Jestem przekonana, że Doktorantka jest w stanie bez większego problemu odpowiedzieć na te uwagi, ponadto większość z nich nie wpływa na wartość naukową ocenianej dysertacji.

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska mgr Joanny Ewy Strzelczyk stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki i dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Spełnia ona wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2024, poz. 1571 ze zm.). Wnoszę zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Joanny Ewy Strzelczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



dr hab. Joanna Małaczewska, prof. UWM