



UNIWERSYTET ROLNICZY

im. Hugona Kollątaja w Krakowie

Katedra Mikrobiologii

30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 24/28

Tel.: +48 12 6624096 tel./fax: +48 12 6331356

Kraków, dnia 15 maja 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Autor: mgr Sanaa Mahdi Oraibi

Tytuł pracy:

**„Zanieczyszczenie mikrobiologiczne materiałów i środowiska zagospodarowania
poubojowych odpadów drobiowych z uwzględnieniem wrażliwości wybranych szczepów
bakterii na antybiotyki”**

Promotor: prof. dr hab. inż. Krystyna Cybulska

Praca wykonana w Zakładzie Chemii, Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska na
Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Dziekana Wydziału Kształtowania
Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego
w Szczecinie Pana dr hab. inż. Edwarda Mellera, prof. nadzw. z dnia 23 kwietnia 2018 roku,
w którym poinformowano mnie, że decyzją Rady Wydziału zostałam powołana
na recenzentkę w/w pracy.

Problematyka badawcza

Przedstawiona do recenzji praca, którą przygotowała mgr Sanaa Mahdi Oraibi,
dotyczy istotnego problemu mikrobiologicznego zanieczyszczenia odpadów drobiowych oraz
ich potencjalnego wpływu na jakość mikrobiologiczną środowiska ich zagospodarowania.

Polska od kilku lat jest liderem w produkcji drobiu w Europie, a produkcja w tej gałęzi
spożywczej stale rośnie, wystarczy wspomnieć, że w roku 2014 produkcja mięsa drobiowego
w naszym kraju została oszacowana przez Zespół Monitoringu Zagranicznych Rynków

Rolnych (FAMMU/FAPA) na 1,78 mln ton (prawie 14% całej produkcji w Unii Europejskiej) a już w roku 2017, według danych GUS produkcja osiągnęła poziom 2,69 mln ton, warto również nadmienić, że prawie 40 % to produkt eksportowy.

Przy tak ogromnej, w skali kraju, produkcji szczególnie istotne są parametry mikrobiologiczne - nie tylko produktu, ale także odpadów poubojowych, których jakość może mieć negatywny wpływ na środowisko (głównie powietrze) w miejscu ich zagospodarowania jak również, w przypadku ich składowania czy też nieprawidłowego przetwarzania bądź utylizacji, na glebę i wodę w otoczeniu zakładów, a nawet zdrowie ludzi. Dlatego tak istotne jest monitorowanie skażenia odpadów stanowiących potencjalne źródło drobnoustrojów chorobotwórczych, które mogą być emitowane do środowiska.

Drobnoustroje z tego rodzaju obiektów mogą być przenoszone również na dalsze odległości i wpływać na mieszkańców pobliskich siedlisk. Do najczęściej występujących patogennych gatunków w przemyśle drobiarskim należą: *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* i *Enterococcus faecalis*. Ze względów bezpieczeństwa pracowników oraz bezpośredniego otoczenia zakładów przetwórczych konieczne jest poznanie drobnoustrojów specyficznych dla przemysłu drobiarskiego.

Według wielu badaczy odpady podrobiowe mogą zawierać patogenne drobnoustroje, pozostałości leków i inne zanieczyszczenia szkodliwe dla samego drobiu, ludzi i zwierząt domowych a nawet roślin. Wśród tych patogenów mogą także występować szczepy wielolekooporne, stanowiące szczególne zagrożenie zdrowotne, co może być skutkiem powszechnego stosowania w hodowli drobiu antybiotyków, pomimo sugestii Unii Europejskiej dotyczących ograniczenia ich użycia w krajach członkowskich jedynie do przypadków niezbędnych i uzasadnionych.

Prace mgr Sany Mahdi Oraibi wpisują się w aktualną problematykę badań związanych z analizą skutków środowiskowych produkcji spożywczej. Podjęta w rozprawie tematyka jest aktualna i doskonale wpisuje się w bieżące potrzeby zarówno przemysłu przetwórstwa mięsnego jak i ochrony środowiska.

Mając na uwadze różnorodność i szeroki zakres badań wykonanych w ramach przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej pozytywnie oceniam opracowanie, które moim zdaniem mieści się w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska.

Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Przedstawiona do recenzji praca zgodnie z artykułem 13.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789), stanowi zbiór 9. artykułów tematycznie związanych z tytułem „Zanieczyszczenie mikrobiologiczne materiałów i środowiska zagospodarowania poubojowych odpadów drobiowych z uwzględnieniem wrażliwości wybranych szczepów bakterii na antybiotyki”.

Treść pracy została podzielona na trzy części, w których uwzględniono zanieczyszczenie mikrobiologiczne w obiektach zagospodarowania odpadów, skażenie bakteriologiczne i mykologiczne materiałów odpadowych oraz problemy rozprzestrzeniania się szczepów stwarzających zagrożenie sanitarne i lekooporność drobnoustrojów izolowanych ze środowiska i odpadów przemysłu drobiarskiego.

Na osiągnięcie autorki, przedstawione w dysertacji, składają się następujące prace:

1. Sanaa Mahdi Oraibi, Krystyna Cybulska, 2016. Microbiological air rating in variety of objects during treatment of the post-slaughter wastes part I *Escherichia coli*. J. Ecol. Eng. 17(5):17–21. DOI: <https://doi.org/10.12911/22998993/64215>
2. Sanaa Mahdi Oraibi, Krystyna Cybulska, 2016. Microbiological air rating in variety of objects during treatment of the post-slaughter wastes part II Bacteria. Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech. 2016, 330(40)4, 147–156 . DOI: 10.21005/AAPZ2016.40.4.16
3. Sanaa Mahdi Oraibi, Cybulska K. 2016. Microbiological air rating in variety of objects during treatment of the post-slaughter wastes part III Moulds and Yeast. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych nr 587, 2016, 83–91.
4. Cybulska K., Sanaa Mahdi Oraibi, Jakubowska B. The occurrence of *Enterobacteriaceae* bacteria in feathers after slaughter of poultry, An International Journal on Controversial Problems of Ecology. Ecological Questions vol. 28 (2017), 25-30. DOI 3010.12775/EQ.2017.035
5. Sanaa Mahdi Oraibi, Cybulska K., 2017. Fungal contamination in poultry waste during the industrial processing. Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech. 2017, 338(44)4, 143–150. DOI: 10.21005/AAPZ2017.44.4.15
6. Krzyśko-Łupicka T., Sanaa Mahdi Oriabi, Kurp E., Walkowiak W.: 2016. A Possible Use of Selected Essential Oils and Citrosept to Inhibit the Growth of *Fusarium solani*

- Mart. (Sacc.). *Advances in Microbiology*. 6, 1159-1165. DOI: 10.4236/aim.2016.614104 (IF=1,07)
7. Kowalczyk P., Sanaa Mahdi-Oraibi, Misiewicz A., Gabzdyl N., Miskiewicz A., Szparecki G., 2018 Feather-Degrading Bacteria: Their Biochemical and Genetic Characteristics. *Arab J Sci Eng* (2018) 43:33–41. doi.org/10.1007/s13369-017-2700-2 (IF=0,87)
 8. Miskiewicz A., P. Kowalczyk, Sanaa Mahdi-Oraibi, K. Cybulska, A. Misiewicz, 2018. Bird feathers as potential sources of pathogenic microorganisms: a new look at old diseases. *Antonie van Leeuwenhoek* 1-15. doi.org/10.1007/s10482-018-1048-2 (IF=1,8)
 9. Sanaa Mahdi Oraibi, Cybulska K., Krzyśko-Łupicka T. 2016: Drug resistance of *E.coli* isolates originating from different stages of the poultry post-slaughter wastes management. *Ekologia Człowieka*. Wydawnictwo Uczelniane ZUT w Szczecinie, 135-136. ISBN 978-83-7663-214-8

Dwie prace są artykułami przeglądowymi a siedem autorskimi pracami ze znacznym udziałem Doktorantki. Wszystkie artykuły składające się na opracowanie są publikacjami współautorskimi. Współautorką artykułów, oprócz Doktorantki, jest nie tylko promotorka pracy, ale także naukowcy z innych ośrodków badawczych, co świadczy o umiejętności współpracy i pracy w zespole.

Doktorantka jest pierwszą autorką w czterech pracach, a jej udział w przygotowaniu sześciu publikacji określony został na 50%, kolejnych dwóch na 30% i jednej na 20%. Do dokumentacji dołączone zostały stosowne oświadczenia współautorów określające wkład i rolę mgr Sany Mahdi Oraibi w procesie tworzenia prac, która polegała zarówno na prowadzeniu badań jak i wykonaniu analiz statystycznych i graficznym opracowaniu wyników, a także przygotowaniu manuskryptów do druku. Artykuły wchodzące w skład pracy doktorskiej ukazały się drukiem w latach 2016-2018, trzy z publikacji składających się na osiągnięcie autorki zostały wydane w czasopismach z listy A cytowanych w bazie JCI (Journal Citation Reports) - ich sumaryczny IF z roku wydania wynosi 3,74, a pięć w czasopismach z listy B. Do publikacji dołączono również streszczenie konferencyjne (praca 9) tematycznie związane z tytułem rozprawy. Liczba punktów wszystkich prac znajdujących się na listach czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to 113.

Zestawienie zostało uzupełnione przez autorkę o streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel i zakres badań, materiały i metody, omówienie prac własnych, podsumowanie i wnioski w języku polskim, a także literaturę.

Pod względem formalnym opracowanie nie wzbudza większych zastrzeżeń – znalezione w pracy błędy stylistyczne i edytorskie - pojawiające się głównie w polskojęzycznym uzupełnieniu, a zapewne w większości wynikające z bariery językowej doktorantki - nie obniżają wartości pracy. Jednak nie mogę pozostawić bez komentarza błędu, który pojawił się w streszczeniu w języku polskim gdzie rodzinę *Enterobacteriaceae* opisano jako rodzaj – w dalszych częściach opracowania i publikacjach jest wpisana poprawna jednostka systematyczna.

Do pracy doktorskiej dołączone zostało również zestawienie pozostałego dorobku naukowego Doktorantki, na który składają się kolejne publikacje (9 wydanych i jedna w druku), liczne streszczenia w materiałach konferencyjnych - zarówno wygłoszonych referatów jak i komunikatów, a także kopie posterów przedstawionych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, w których autorka brała aktywny udział.

Ocena pracy pod względem metodycznym

Prace przedstawione w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej zostały, w moim mniemaniu, słusznie podzielone na trzy części w których kolejno przedstawiono zagadnienia związane z zanieczyszczeniem powietrza, zanieczyszczeniem materiałów oraz problemy rozprzestrzeniania się szczepów bakterii lekoopornych i stwarzających zagrożenie sanitarne. Badania mikrobioaerozolu wykonano w kierunku określenia ogólnej liczebności bakterii mezofilnych, liczebności promieniowców, liczebności grzybów (pleśni i drożdży), a także drobnoustrojów wskaźnikowych: bakterii *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. oraz *Clostridium* sp.. Zważywszy na charakter zakładu wybór oznaczanych organizmów oraz punktów pomiarowych uważam za w pełni uzasadniony. Badania mikrobiologiczne powietrza wykonano metodą sedymentacyjną zgodnie z normami (PN-89/Z-04111/02; PN-89/Z-04111/03), szkoda, że w badaniach nie wykorzystano metod wolumetrycznych, które dają bardziej wiarygodne wyniki i są obecnie metodami referencyjnymi. Wypada również w tym miejscu zaznaczyć, że normy na których oparła się w swoich badaniach autorka zostały wycofane – jednak, ponieważ nie zostały zastąpione nowymi aktami normatywnymi (aktualnie nie ma w Polsce obowiązujących norm dotyczących mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego), nie można mówić o błędnych metodach

badawczych czy interpretacji wyników, jednak warto było rozważyć wykorzystanie norm obowiązujących w innych krajach lub propozycji dopuszczalnych stężeń drobnoustrojów w powietrzu, które zostały opracowane przez Zespół Ekspertów ds. Czynników Biologicznych Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy.

W drugiej części pracy przedstawiono, między innymi, wyniki badań dotyczących zanieczyszczenia materiałów poubojowych bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz grzybami. W analizach wykorzystano metodę seryjnych rozcieńczeń, która jest rutynowo wykorzystywana w mikrobiologicznych analizach ilościowych. Jedyna moja uwaga dotyczy w tym miejscu (m.in. strona 13, 16) niepoprawnego zapisu jednostek w uzupełnieniu prac badawczych w języku polskim – zgodnie z układem SI powinno być cm^3 a nie ml.

Ta część pracy, moim zdaniem, słusznie została uzupełniona artykułem przeglądowym dotyczącym bakterii keratynolitycznych zdolnych do degradacji piór.

Zaprezentowane zostały również wyniki badań dotyczących wpływu wybranych olejków eterycznych na wzrost grzybów - nie dostrzegam jednak zasadności umieszczenia w zestawieniu pracy pt. „A Possible Use of Selected Essential Oils and Citrosept to Inhibit the Growth of *Fusarium solani* Mart. (Sacc.)” opublikowanej w *Advances in Microbiology*. Byłoby to zrozumiałe, gdyby organizmy testowe (w tym przypadku *F. solani*) pochodziły z materiałów poubojowych i byłaby to próba ograniczenia ich rozwoju w odpadach – jednak w pracy nie znalazłam tej informacji. Bardziej wskazane wydaje się uwzględnienie chociażby artykułu pt. „The number of *E. coli* and *C. perfringens* bacteria in poultry waste and subsequent phases of composting”, który autorka również ma w swoim dorobku. Dlatego oczekuję od Doktorantki wyjaśnienia tej kwestii.

W części trzeciej autorka zaprezentowała publikację przygotowaną na podstawie literatury dotyczącej problemów rozprzestrzeniania się drobnoustrojów patogennych, których źródłem mogą być pióra oraz wyniki badań własnych dotyczących lekooporności bakterii *Escherichia coli* izolowanych z szlamu, osadów po wirowaniu i kompostu. W badaniach zastosowano poprawne metody badawcze rekomendowane przez Krajowy Ośrodek Referencyjny do spraw Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) oraz The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), analizy wykonano z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej. Mam jednak uwagę do konkluzji zawartej w tej pracy (numer 9) - cytuję: “Wyizolowane w niniejszej pracy szczepy *Escherichia coli* w prawie 60% wykazywały odporność na badane antybiotyki, podczas gdy przypadki

wrażliwości stwierdzono jedynie u około 25%” – gdzieś zginęło 15% albo autorka zastosowała „skrót myślowy” wymagający jednak wyjaśnienia. Ponieważ cytowana praca nie zawiera pełnych wyników (będąc właściwie obszernym komunikatem konferencyjnym) nie jestem w stanie samodzielnie zinterpretować rezultatów uzyskanych w trakcie prowadzenia badań i wskazać dokładnie, gdzie został popełniony błąd.

Osobiście uważam, że praca pt. „Drug resistance of *E. coli* isolates originating from different stages of the poultry post-slaughter wastes management” powinna ukazać się w czasopiśmie o wyższej randze ze względu na wysoką wartość przeprowadzonych w jej ramach badań.

Rezultaty wszystkich wykonanych badań poddano poprawnej analizie statystycznej, a wyniki przedstawiono graficznie na wykresach lub w postaci tabel w poszczególnych publikacjach.

Ocena merytoryczna pracy

Autorka pracy postawiła sobie ambitny cel dokonania oceny bioróżnorodności drobnoustrojów związanych z odpadami przemysłu drobiarskiego oraz ich charakterystyki, zarówno pod względem wielkości zakażenia - szczególnie sanitarnego - oraz składu gatunkowego, jak też zbadania elementów potencjału metabolicznego i lekooporności wybranych izolatów bakterii.

Teoretyczne podstawy związane z celami badawczymi mgr Sanaa Mahdi Oraibi przedstawiła we wstępach do poszczególnych prac, w których zaprezentowała wyniki badań własnych, i dwóch pracach przeglądowych.

Zamierzony cel Doktorantka osiągnęła przeprowadzając szereg analiz laboratoryjnych realizowanych w trzech etapach badając:

- zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza w obiektach zagospodarowania poubojowych odpadów drobiowych (prace 1, 2 i 3);
- zanieczyszczenie bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* i grzybami patogennymi materiałów odpadowych, zwalczanie oraz charakterystyka biochemiczna i genetyczna drobnoustrojów zasiedlających pióra (prace 4, 5, 6 i 7);
- rozprzestrzenianie się szczepów stwarzających zagrożenie sanitarne oraz poziom zjawiska antybiotykooporności w środowisku odpadów przemysłu drobiarskiego (prace 8 i 9)

Tytuł przedstawionej do recenzji rozprawy odpowiada zakresowi badań wykonanych w trakcie jej realizacji. Chociaż w pracy przedstawiono liczne wyniki analiz to z całą pewnością

wiele zagadnień nadal pozostaje otwartych i daje Doktorantce możliwości na prowadzenie dalszych wnikliwych badań. Zabrakło mi jednak w pracy informacji i sugestii dla zakładów drobiarskich dotyczących sposobu ograniczenia zanieczyszczenia badanych materiałów i emisji drobnoustrojów do powietrza. Niemniej jednak, mając na uwadze przedstawione dane, uważam, że postawiony cel pracy został zrealizowany, a uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie stosownych wniosków.

W poszczególnych etapach badań Doktorantka wykazała, że :

1. W powietrzu na terenie obiektów zajmujących się zagospodarowaniem i kompostowaniem poubojowych odpadów drobiarskich stwierdzono obecność licznych bakterii i grzybów. Wielkość skażenia bakteriami i grzybami wielokrotnie była bardzo wysoka i przekraczała dopuszczalne normy.

W ponad 60% pomiarów stwierdzono występowanie bakterii *Escherichia coli* co świadczy o złym stanie sanitarnym powietrza i może stanowić potencjalne zagrożenie dla ludzi.

Liczebność bakterii i grzybów zależna była od lokalizacji punktu badawczego i terminu wykonania badań. Największe zanieczyszczenie bakteriami obserwowano w powietrzu podczyszczalni chemicznej (prace numer 1, 2 i 3);

2. Zanieczyszczenie piór po uboju drobiu bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* było znaczne i mieściło się w granicach $10^5 - 10^{12}$ NPL·1g⁻¹ s.m. Największe zakażenie wystąpiło w okresie kwiecień – maj. Pióra kaczki i kurze były znacznie bardziej zanieczyszczone niż indycze i gęsie.

Zakażenie grzybami stwierdzono we wszystkich badanych materiałach, we wszystkich ubojniach i terminach pomiarów. Nie wystąpiły jednoznaczne prawidłowości jego zmian w ciągu roku. Rosło ono w kolejności: pióra gęsie, pióra kurze, pióra kaczki i indycze. Dla pozostałych materiałów odpowiednio: kompost, szlam, osad z wirówki. Największe zakażenie badanych materiałów grzybami stwierdzono w tej samej ubojni co zanieczyszczenie bakteriologiczne.

Stwierdzono znaczne różnice w stopniu zanieczyszczenia mikrobiologicznego piór i innych badanych materiałów w zależności od źródła ich pochodzenia (ubojni) co sugeruje, że istotnym czynnikiem wpływającym na skażenie bakteriologiczne piór miała higiena uboju (prace numer 4 i 5).

3. Prawie 60% wyizolowanych i przebadanych w ramach niniejszej pracy szczepów *Escherichia coli* wykazało oporność na badane antybiotyki, a pochodzenie izolatów

miało wpływ na ich reakcję – wyizolowane ze szlamu charakteryzowały się mniejszą wrażliwością na badane antybiotyki (praca numer 9).

Prowadząc swoje badania mgr Sanaa Mahdi Oraibi zwróciła uwagę na niezwykle ważny problem związany z ryzykiem mikrobiologicznym w procesie zagospodarowania odpadów drobiowych, dokonując przekrojowej analizy problemu. Opublikowane artykuły stanowią istotny wkład Doktorantki w literaturę przedmiotu dotyczącą problemów przetwórstwa mięsnego, zagospodarowania odpadów i ochrony powietrza.

Wniosek końcowy

Przedłożona do oceny praca doktorska pt. „Zanieczyszczenie mikrobiologiczne materiałów i środowiska zagospodarowania poubojowych odpadów drobiowych z uwzględnieniem wrażliwości wybranych szczepów bakterii na antybiotyki” przygotowana przez mgr Sanę Mahdi Oraibi wskazuje, że autorka posiada praktyczną i teoretyczną wiedzę z zakresu nauk rolniczych, zdolna jest do planowania eksperymentów, opanowała techniki laboratoryjne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska, spełniając tym samym wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

W związku z powyższym wnioskuję do członków Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr Sany Mahdi Oraibi do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Dr hab. inż. Maria J. Chmiel

