

Dr hab. inż. Beata Tokarz-Deptuła, prof. US
Instytut Biologii
Uniwersytet Szczeciński

Szczecin, 27.10.2023r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Xymeny Stachurskiej
pt. „Wpływ wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność
bakteriolityczną bakteriofagów”

Niniejsza recenzja jest sporządzona na zlecenie Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego (ZUT) w Szczecinie zgodnie z pismem L.dz: WBIHZ/RDZiR/130/2023 z dnia 20 września 2023r na podstawie otrzymanego egzemplarza pracy doktorskiej. Praca została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii pod kierunkiem dr hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT (promotor).

1. Formalna ocena pracy

Przedłożona mi do oceny praca doktorska spełnia wymagania postawione pracom naukowym w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie biotechnologia. Niniejsza praca została przygotowana w formie cyklu trzech publikacji powiązanych tematycznie oraz jednej nieopublikowanej pracy udostępnionej jako preprint w bazie bioRxiv. Ogólna liczba punktów MEiN zgodnie z rokiem ukazania się prac wynosi 310, a sumaryczny IF 14,268. Zasadniczą częścią pracy jest podsumowanie publikacji wchodzących w skład dysertacji przygotowane w formie Autoreferatu. W jego skład wchodzi Streszczenie i Abstrakt oraz 8 głównych rozdziałów: Wprowadzenie, Hipotezy, Cel badawczy, Materiał i metody badawcze z wyszczególnionymi 7 podrozdziałami zawierającymi: Mikroorganizmy, Czynniki przeciwdrobnoustrojowe, Namnażanie bakteriofagów oraz przygotowanie lizatów, Określenie najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy agaru w celu uwidocznienia efektu synergii fagów i antybiotyków (PAS), Określenie wpływu wybranych nanocząsteczek na wiriony faga litycznego typu T4 oraz obserwacja interakcji, Określenie wpływu ekstraktów roślinnych na referencyjne bakteriofagi lityczne, Analiza

statystyczna, następnie rozdział Uzyskane wyniki badań. Rozdziałami następnymi są Wnioski, Piśmiennictwo zawierające 43 pozycje, kończące główne osiągnięcie, a następnie rozdział 8 - Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych z 3 podrozdziałami: Osiągnięcia naukowe związane z badaniami z wykorzystaniem bakteriofagów litycznych, Osiągnięcia naukowe związane z badaniami z wykorzystaniem czynników przeciwdrobnoustrojowych, Osiągnięcia naukowe związane z działalnością badawczą Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii. W załączniku nr 1 zamieszczono kopie publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską, w załączniku nr 2 kopie suplementów publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską, w załączniku nr 3 oświadczenia współautorów publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską wraz z określeniem ich indywidualnego udziału, w załączniku nr 4 sumaryczne zestawienie dorobku naukowego. Poszczególne rozdziały i podrozdziały stanowią zwarty materiał informacyjno-wynikowy związany z realizowanym tematem pracy doktorskiej mgr Xymeny Stachurskiej i który został zawarty w publikacjach wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską. Prace te zostały opublikowane w latach 2021-2023, w których mgr Stachurska jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, których wartość punktowa MEiN z dnia 1grudnia 2021 r, zgodnie z rokiem ukazania się prac wynosi 310, a sumaryczny Impact Factor (IF) za cykl tych prac zgodnie z rokiem ich ukazania się wynosi 14,268.

W cyklu tych prac, pomimo ich charakteru wieloautorskiego, Autorka wskazuje na wiodący udział w badaniach od udziału w opracowaniu koncepcji i metodologii po udział w opracowaniu, interpretacji i opublikowaniu wyników, a Jej udział procentowy został określony od 70% do 85% (w pracy w pracy D-1 80% D-2 70%, w pracy D-3 85%). Przeprowadzone badania mają charakter interdyscyplinarny i wykonane są we współpracy z pracownikami naukowymi, mającymi doświadczenie w badaniach w zakresie mikrobiologii, chemii, biotechnologii i nanotechnologii, z takich ośrodków naukowych, jak: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie oraz Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie. Współpraca ta obejmowała pomoc w zakresie wykonania badań i analiz oraz wykorzystania sprzętu, a także pomocy w interpretacji otrzymanych wyników i przygotowania publikacji.

Dobór publikacji, w cyklu przedstawiającym dysertację doktorską jest prawidłowy do przedłożonego tematu.

2. Ocena merytoryczna pracy

Rozprawa doktorska mgr Xymeny Stachurskiej dotycząca zagadnienia w zakresie opracowania możliwości wpływu wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność lityczną bakteriofagów z głównym nastawieniem na interakcje pomiędzy zastosowanymi w eksperymentach czynnikami, to wynik Jej trzyletniej pracy badawczej. Autorka pracy przedstawiła trzy wątki swoich badań w ramach których wskazała na działanie trzech wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych jakimi są antybiotyki, nanomateriały i substancje pochodzenia naturalnego- w szczególności ekstrakty roślinne w celu ich wpływu na aktywność lityczną bakteriofagów oraz możliwości ich wykorzystania w układach łączonych w ramach alternatywnych możliwości zwalczania infekcji bakteryjnej. Znalazło to odzwierciedlenie w przedstawionych hipotezach, które szczegółowo dotyczą: określenia potencjalnych możliwości interakcji czynników przeciwdrobnoustrojowych i bakteriofagów litycznych w celu ich jednoczesnej aplikacji w terapiach łączonych w zwalczaniu infekcji bakteryjnych; wskazania wpływu czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność lityczną bakteriofagów i zaobserwowanie charakteru interakcji pomiędzy tymi wybranymi czynnikami; wskazanie najefektywniejszej modyfikacji zastosowanej metody do wstępnego wykrywania synergii antybiotyków i fagów; możliwości wpływu nanocząsteczek na bipolarne wiriony faga rodzaju *Myoviridae*; wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych do analizy interakcji pomiędzy ekstraktem roślinnym - bakteriofagiem i gospodarzem bakteryjnym, by wykazać zasadność różnic i właściwą ocenę w oddziaływaniu w środowiskach statycznym i dynamicznym właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanych czynników oraz wykazać możliwość i zależność wpływu zastosowanych ekstraktów roślinnych na przebieg lizy fagowej testowanych bakteriofagów litycznych i gospodarza bakteryjnego. Wszystkie te założenia – hipotezy przedstawione przez mgr Xymenę Stachurską znalazły swoje odzwierciedlenie w przedstawionym celu dysertacji wraz z celami szczegółowymi. Do zrealizowania w/w celu

Autorka użyła litycznego bakteriofaga typu T4, a także szczep gospodarza bakteryjnego tego faga jakim jest *Escherichia coli* K-12 C600 oraz referencyjne bakteriofagi lityczne phi6, (DSM 21518), MS2 (DSM 13767) i T4 (DSM4505) wraz z odpowiadającymi im szczepami gospodarzy bakteryjnych, takimi jak: *Pseudomonas syringae* (DSM21482), *Escherichia coli* (DSM 5695) i *Escherichia coli* (DSM613), jak i szeroki panel antybiotyków w ilości 43, należących do różnych grup, przedstawiony w tabeli 1, sześć różnych nanomateriałów i ekstrakty roślinne z ziela jeżówki purpurowej i z ziela stewii. Oceniając pracę należy podkreślić, że metody laboratoryjne, dotyczące namnażania bakteriofagów i przygotowanie lizatów, jak i określenie najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy agaru w celu uwidocznienia efektów synergii fagów i antybiotyków (PAS), określenie wpływu wybranych nanocząsteczek na wiriony faga litycznego typu T4 i obserwacja interakcji oraz określenie wpływu ekstraktów roślinnych na referencyjne bakteriofagi lityczne, a także analiza statystyczna zastosowane w badaniach, według mojej oceny zostały przemyślane i właściwie dobrane. Warto zwrócić uwagę na skrupulatność i pracowitość Doktorantki, co poskutkowało zebraniem i opisaniem wyników w rozdziale 5 autoreferatu, w którym opisuje Ona bardzo skrupulatnie efekty podjętych zadań badawczych wskazując jednocześnie na umieszczenie ich w przedstawionych w dysertacji publikacjach. Dzięki nim dowiadujemy się, że chociaż antybiotyk, który może wykazywać efekt synergii antybiotykowo - fagowej (PAS) z fagiem typu T4 standardową metodą krążkową, to jednak należałoby przeprowadzać dalsze badania, by wskazać czy uzyskany efekt będzie także zadawalający jeśli antybiotyk będzie zastosowany bezpośrednio do agaru. Najlepsze wyniki dotyczące efektu PAS uzyskano za pomocą modyfikacji metody dwuwarstwowego agaru (DLA) z użyciem krążków antybiotykowych, a w celu uzyskania największej ilości zróżnicowanych morfologicznie łysinek najefektywniejszym wariantem była właśnie możliwość zaaplikowania antybiotyku bezpośrednio do agaru dolnego, co pozwoliło na powolną dyfuzję leku do strefy wzrostu bakterii. Ponadto, dzięki współpracy mgr Xymeny Stachurskiej z pracownikami Katedry Fizykochemii Nanomateriałów ZUT przetestowano wpływ wybranych nanocząsteczek na aktywność lityczną faga typu T4. Analiza potencjału zeta (ZP) wykazała, że największe maksymalne i minimalne ładunki tego potencjału miały dwutlenek tytanu (TiO_2 , 36 mV) i nanosfery krzemionkowe (SiO_2 , -51 mV). Testy mikrobiologiczne pozwoliły natomiast na określenie wpływu nanocząsteczek na

faga T4₅, a analiza mikroskopii elektronowej (TEM) na wyjaśnienie obserwowanych zjawisk. Dzięki tym badaniom udowodniono, że nanocząsteczki o ujemnym ZP powodują przyczepienie się faga za pomocą jego włókien ogonka, choć w niektórych przypadkach zaobserwowano wznowienie aktywności fagowej, gdy fag odłączał się od nanocząsteczki i zostawał usunięty z jej środowiska. Zaobserwowano również zwiększoną aktywność lityczną faga w obecności nanocząsteczek. Natomiast we współpracy Doktorantki z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych ZUT przetestowano wpływ wybranych ekstraktów roślinnych (*Echinacea (E.) purpurea* – jeżówka purpurowa i *Ruta (R.) graveolens* -) na aktywność lityczną fagów referencyjnych. W efekcie tych badań wskazano, że wpływ niskich stężeń ekstraktów metanolowych *E. purpurea* i *R. graveolens* w środowisku dynamicznym na przebieg lizy faga zależy od gatunku faga i gospodarza bakteryjnego. Wysokie stężenia ekstraktów mogą w dużym stopniu eliminować aktywność fagolityczną poprzez wywieranie silniejszego działania stymulującego na komórki bakteryjne, jednak możliwe jest również uzyskanie aktywności antyfagowej tych stężeń w środowisku dynamicznym. Wskazano również, że w niektórych przypadkach ekstrakty mogą wpływać na samą aktywność faga, niezależnie od gatunku faga i żywiciela. Można zatem skonkludować, że publikacje będące składem cyklu stanowiącego rozprawę doktorską mgr Xymeny Stachurskiej są zebrane w postaci wniosków zawartych w rozdziale 6 autoreferatu. Doktorantka wykazała, że:

- zmodyfikowana metoda podwójnej warstwy agaru (DLA) poprawia obserwację efektu synergii (PAS) wywołany przez wybrane antybiotyki aplikowane z litycznym fagiem typu T4;
- wybór modyfikacji metody DLA jest zależny od rodzaju użytego antybiotyku w odniesieniu do konkretnego bakteriofaga i gospodarza bakteryjnego;
- najefektywniejszą metodą wizualizacji efektu PAS jest standardowa metoda DLA z aplikacją krążków antybiotykowych na agarze górnym, a w celu uzyskania największej ilości zróżnicowanych morfologicznie łysek jest podanie antybiotyku bezpośrednio do agaru dolnego, w obecności agaru górnego;

- ujemny lub dodatni ładunek nanocząsteczek nie jest wystarczający by bakteriofag przyłączał się do nich w sposób specyficzny, a co może mieć wpływ na jego aktywność;
- największy wpływ na interakcje fag-nanocząsteczka ma wartość potencjału zeta nanocząsteczki;
- elektrostatyczne wiązanie ogonków bakteriofagów z nanocząsteczkami o ujemnym ZP jest procesem odwracalnym;
- charakter oddziaływań między fagami a nanocząsteczkami można przewidzieć na podstawie ładunków cząstek wyrażonych w wartościach ZP;
- interakcje ekstraktów roślinnych i fagów zaobserwowane w środowisku statycznym różnią się od zaobserwowanych w środowisku dynamicznym;
- wykorzystane ekstrakty roślinne aplikowane z litycznymi fagami MS2, T4 i phi6 wskazują wobec siebie działanie antagonistyczne, powodując stymulujący wpływ zależny od stężenia na komórki bakteryjne;
- interakcja fagów i określonych ekstraktów roślinnych może być efektem wzmocnienia pierwotnego efektu stymulującego poprzez zmianę środowiska ze statycznego na dynamiczne na skutek kontaktu tych czynników z komórkami eksponowanych bakterii.

Przedstawione wnioski trafnie odpowiadają na postawiony w pracy cel badawczy i cele szczegółowe.

Oceniając rozprawę doktorską mgr Xymeny Stachurskiej zwracam jednak uwagę na zawarte sformułowanie w jej tytule, a mianowicie cyt.: „...aktywność bakteriolityczną bakteriofagów”. Starczyłoby podanie ...aktywność lityczną bakteriofagów”. Ponadto, według mojej oceny, niepotrzebnie Autorka często używa w opisach swojego osiągnięcia naukowego sformułowania cyt.: „badania naukowe”, czy: „problem naukowy” itp., co wydaje się zbędne, bo wiadomo, że dotyczą one osiągnięcia naukowego Doktorantki. Ponadto, przedstawione w rozdziale 6 (rozdział Wnioski), zawarte w 10 punktach wnioski, mogłyby być przedstawione bardziej radykalnie Jako odpowiedź na cel badawczy zawarty w rozdziale 3, gdyż według

mojej oceny, takie ich przedstawienie sugeruje, iż można je odebrać jako podsumowanie efektu zadań badawczych, bądź słowne „udokumentowanie” celów szczegółowych podanych przez Doktorantkę. Z drugiej jednak strony należy zaznaczyć, że udało się w ten sposób zestawić wszystkie rezultaty wielokierunkowych badań, mających na celu określenie, czy dane czynniki przeciwdrobnoustrojowe mają potencjał koaplikacyjny z wybranymi fagami litycznymi, a tym samym czy istnieje możliwość ich jednoczesnego stosowania w ramach łączonej terapii antybakteryjnej.

Pozostałe informacje przedstawione w rozdziale 8 autoreferatu o tytule „Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych” wskazują na systematyczny rozwój naukowy Doktorantki, który rozpoczęła w roku 2016 w Katedrze Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej (obecnie jest to Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii) i udokumentowany został w 14 publikacjach, 2 patentach, 1 zgłoszeniu patentowym oraz 3 rozdziałach w monografiach naukowych. Na uwagę zasługuje m.in. Jej udział jako wykonawcy w 4 projektach naukowych, w tym w grantie „Preludium” finansowanym przez NCN, w temacie „Wpływ nanomateriałów fotoaktywnych na stabilność mikrobiologiczną i skład chemiczny soku winogronowego i wina”, czy też w projekcie badawczo-rozwojowym realizowanym w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Zachodniopomorskiego, pt. „Opracowanie powłok i granulatów tworzyw sztucznych o przedłużonym działaniu antywirusowym i antybakteryjnym”, w którym prowadzono badania, m.in. w oparciu o model fagowy. Jako studentka studiów doktoranckich (brak jednak określenia czasu studiów, co sugeruje że był to czas dawnej nomenklatury studiowania, choć jest to podane w załączniku 4 dokumentacji) odbyła 4 staże krajowe (czas ich trwania i miejsce stażu jest podany jedynie w załączniku 4 dokumentacji). Odbyła 6 certyfikowanych szkoleń z obsługi specjalistycznego sprzętu (podobnie jak w przypadku odbytych staży, jest to podane jedynie w załączniku 4 dokumentacji). Zwracam jednak uwagę na to, że ułatwiłoby znacznie rozeznanie się w tym zakresie, gdyby Doktorantka zamieściła te informacje dla porządku w głównym tekście autoreferatu. Na uwagę zasługuje także wyróżnienie Doktorantki jako laureata Stypendium Naukowego Prezydenta Miasta Szczecin, dla najzdolniejszych studentów i doktorantów w roku 2021.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie przedstawionego w jej celu problemu badawczego. Jednocześnie wskazany indywidualny wkład Kandydatki w realizację badań, wykonanie części eksperymentalnej oraz opracowanie i interpretacje wyników potwierdza wiedzę teoretyczną mgr Xymeny Stachurskiej z zakresu dyscypliny biotechnologia w dziedzinie nauk rolniczych, a także świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej spełniając wymogi określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017r., poz.1789) oraz kryteria zawarte w § 6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r., w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2018 poz. 261) – zgodnie z art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Mając powyższe na uwadze przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wniosek o dopuszczenie mgr Xymeny Stachurskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie biotechnologia.

dr hab. inż. Beata Tokarz-Deptuła, prof. US



Instytut Biologii US