

Olsztyn, 14.09.2023

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Woroszyło:

**Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na
efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii
patogennych**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT
na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie, w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do recenzji praca jest cyklem trzech badawczych, powiązanych tematycznie publikacji, opatrzonych wspólnym tytułem: **Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii patogennych.**

W skład pracy wchodzi trzy anglojęzyczne prace opublikowane w czasopismach z listy JCR.

W skład cyklu wchodzi:

1. Woroszyło M., Ciecholewska-Juśko D., Junka A., Pruss A., Kwiatkowski P., Wardach M., Fijałkowski K. (2021). The impact of intraspecies variability on growth rate and cellular metabolic activity of bacteria exposed to rotating magnetic field. *Pathogens*.10 (11), 1427.
2. Woroszyło M., Ciecholewska-Juśko D., Junka A., Wardach M., Chodaczek G., Dudek B., Fijałkowski K. (2021). The effect of rotating magnetic field on susceptibility profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains exposed to activity of different groups of antibiotics. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (21), 11551

3. Woroszyło M., Ciecholewska-Juśko D., Junka A., Drozd R., Wardach M., Migdał P., Szymczyk-Ziółkowska P., Styburski D., Fijałkowski K. (2021). Rotating magnetic field increases β -lactam antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. International Journal of Molecular Sciences. 22 (22), 12397

Dwie prace opublikowano w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences i jedną w Pathogens. Wszystkie prace opublikowano w uznanych czasopismach z zakresu dziedziny nauk rolniczych, dyscypliny biotechnologia. Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) tych publikacji jest wysoki, wynosi 16,942. Wszystkie prace są wieloautorskie (7-9 autorów). Po zapoznaniu się z publikacjami które są wyjątkowo obszerne jak na prace badawcze (24-29 stron) zawierają bardzo dużą liczbę analiz przeprowadzonych różnymi technikami badawczymi z różnych obszarów nauki, liczba współautorów jest dla mnie jak najbardziej adekwatna do przeprowadzonych badań. Między innymi prowadzono badania molekularne, analizy z użyciem mikroskopu konfokalnego oraz skaningowego mikroskopu elektronowego oraz analizy w użyciu chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas. Po zapoznaniu się z oświadczeniami współautorów oraz Doktorantki nie mam wątpliwości, że miała Ona wiodący udział w ich powstawaniu. Doktorantka jest pierwszym Autorem we wszystkich publikacjach, brała udział w opracowywaniu koncepcji i metodologii badań, wykonywała znaczną część analiz, opracowywała wyniki i czynnie brała udział w procesie publikacyjnym. Zaplanowanie tak dużej liczby doświadczeń, znalezienie odpowiednich osób i „zebranie wszystkiego” tak aby powstały publikacje wymagało dużego zaangażowania, skrupulatności i umiejętności współpracy.

Cykl publikacji Doktorantka poprzedziła dobrze przygotowanym wstępem teoretycznym, przedstawiła hipotezy oraz cel pracy, materiały i metody badawcze, omówiła wyniki i przedstawiła wnioski. Było to zapewne trudne zadanie aby tak obszerne badania zawrzeć w tak syntetycznym opisie, ale w moim odczuciu udało się w pełni osiągnąć zamierzony cel, przy każdym punkcie znajdują się odnośniki do publikacji więc bez problemu można odnaleźć omawiane etapy w konkretnych artykułach. Ponadto Doktorantka przedstawiła swoje dotychczasowe osiągnięcia naukowe z okresu studiów doktoranckich, oraz aktualnie realizowane badania co pozwoliło Recenzentowi utwierdzić się w przekonaniu, że Pani mgr inż. Marta Woroszyło jest bardzo ambitną i pracowitą osobą o czym świadczą liczne doniesienia konferencyjne, aktywne uczestnictwo w kole naukowym oraz pozostałe nie wchodzące w skład pracy doktorskiej artykuły naukowe .

Ocena merytoryczna pracy

Według WHO rosnąca oporność na antybiotyki jest poważnym zagrożeniem i jest obecnie jednym z największych problemów zdrowia publicznego. Uważam, że praca doktorska Pani mgr inż. Marty Woroszyło której głównym celem była analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania antybiotyków względem bakterii patogennych wpisuje się w nurty aktualnych badań naukowych. Doktorantka poza podstawowym celem przedstawiła również dziewięć celów szczegółowych które konsekwentnie realizowała w poszczególnych etapach badań. W pierwszym etapie badań oceniała wpływ wirującego pola magnetycznego na komórkową aktywność metaboliczną bakterii. Przeprowadzone badania były kompleksowe, obejmowały zarówno pałeczki, laseczki jak i ziarniaki różnych rodzajów i gatunków bakterii, przeprowadzono analizy na kilku szczepach tego samego gatunku co pozwoliło Doktorantce stwierdzić, że wpływ wirującego pola magnetycznego w znacznym stopniu jest szczepo-zależny.

Kolejne etapy badań skupiały się na kilku szczepach *Staphylococcus aureus*, zarówno metycylinoopornych jak i metycylinowrażliwych. Doktorantka uzasadniła wybór tego gatunku ziarniaków i zgadzam się z nią, że zarówno ogromny potencjał chorobotwórczy, zdolność do nabywania oporności oraz rozpowszechnienie w środowisku naturalnym predysponuje te drobnoustroje do jak największej uwagi badaczy. Doktorantka oznaczyła u badanych izolatów gen *mecA* oraz określiła pokrewieństwo genetyczne z użyciem techniki PFGE. Przeprowadziła szereg analiz, które bardzo dobrze opisała i udokumentowała w przygotowanych publikacjach. Wykonała między innymi ocenę wpływu wirującego pola magnetycznego na liczbę komórek *S. aureus* zdolnych do wzrostu na podłożu stałym, wykonała analizę zmian w efektywności działania antybiotyków oraz określiła efekt poekspozycyjny. Doktorantka wykazała się dużą dociekliwością i chęcią bardzo dokładnego zbadania wpływu wirującego pola magnetycznego na komórki *S. aureus*, w tym celu przeprowadziła analizę zmian w morfologii komórek, zmian w integralności ścian komórkowych w biofilmie oraz określiła liczbę żywych i martwych komórek z użyciem fluorescencji. Bardzo ciekawym elementem badań jest moim zdaniem analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na uwalnianie antybiotyków z krążków bibułowych oraz ich dyfuzję w agarze. Ten element badań wskazuje na bardzo skrupulatne podejście do badań, dociekliwość oraz chęć wyciągnięcia poprawnych wniosków i wyeliminowanie tych elementów które mogłyby w tym przeszkodzić. Za niezmiernie istotne uważam wykazanie, że wirujące pole magnetyczne zaburza integralność ścian komórkowych

S. aureus w biofilmie bez względu na jego grubość oraz gęstość komórek w jego poszczególnych warstwach.

Na zakończenie Autorka sformułowała dziewięć wniosków przedstawiających jej osiągnięcia poprzedzając je streszczeniem wyników wraz z komentarzami do nich. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka właściwie zaplanowała badania, wykonała ogrom pracy laboratoryjnej i umiejętnie wszystko opisała stosując również metody statystyczne które ułatwiły wyciągnięcie wniosków.

Zawarte w cyklu „Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii patogennych: prace są już opublikowane w renomowanych czasopismach i poddane recenzjom, i ja również oceniam je bardzo pozytywnie. Pozwolę sobie sformułować kilka pytań, do których poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się/dyskusję:

- dlaczego analizy wpływu WMP na zmiany w liczebności żywych i martwych komórek wykonano po 12 godzinach a ocenę zmian w kinetyce wzrostu i komórkowej aktywności metabolicznej zakończono po 9 godzinach

- w celu analizy zmian w efektywności działania antybiotyków w wirującym polu magnetycznym wykonano ocenę wrażliwości na antybiotyki metodą dyfuzyjno-krażkową wg wytycznych EUCAST, w jakim celu hodowle eksponowano na wirujące pole magnetyczne przez 12 godzin, mierzono dające się odczytać strefy zahamowania wzrostu a następnie prowadzono inkubację bez działania wirującego pola magnetycznego? Z jakiego powodu nie inkubowano hodowli przez cały rekomendowany przez EUCAST czas w wirującym polu magnetycznym.

- zastosowano niezmiernie skomplikowaną i pracochłonną metodę oceny wpływu wirującego pola magnetycznego na liczbę komórek *S. aureus*. zdolnych do wzrostu na podłożu stałym. Zawiesiny szczepów posiewano na podłoże Muller-Hinton, inkubowano w wirującym polu magnetycznym przez 12 godzin, następnie wykonywano ‘zmyw’ kolonii z użyciem PBS, posiewano na podłoże BHIA i inkubowano kolejne 24 godziny bez wpływu wirującego pola magnetycznego. Doktorantka wyjaśniła że eksperyment ten wykonano w celu oceny potencjału bakteriobójczego samego WMP wobec eksponowanych bakterii. Czy nie wystarczyłoby w tym celu posiać powierzchniowo rozcieńczoną hodowlę o potencjalnie policzalnej liczbie bakterii np. 10^2 - 10^3 cfu/ml, zastosować jedno podłoże hodowlane, porównać liczbę kolonii na płytkach eksponowanych i kontrolnych?

- podczas analiz zmian w integralności ścian komórkowych hodowli w biofilmie traktowanym cefoksytyną i eksponowanych na wirujące pole magnetyczne stosowano hodowlę bakteryjną o

gęstości 1×10^5 cfu/ml, mam pytanie czysto techniczne, w jaki sposób przygotowano tak ściśle określoną gęstość hodowli, w pozostałych eksperymentach podawano przybliżone wartości co jest dla mnie zrozumiałe.

WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Marty Woroszyło pt.: „Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii patogennych”, spełnia wymagania zapisane w art. 13 ust. 1 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz. U. z 203 r. Nr 65, poz.595; z późn. zm.), jest bowiem samodzielnym i wartościowym dorobkiem naukowym, prezentuje wysoki poziom merytoryczny oraz wnosi do nauki wiele elementów poznawczych i ma znaczną wartość aplikacyjną.

Proszę Radę Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o przyjęcie pracy i dopuszczenie Panią mgr inż. Martę Woroszyło do publicznej obrony zawartych w niej tez. Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową i aplikacyjną recenzowanej pracy wnoszę o jej wyróżnienie.

Anne Zade-oworka