

Lublin, 25 sierpnia 2023

Monika Janczarek
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
tel. 81-537-59-09
monika.janczarek@mail.umcs.pl

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Woroszyło

pt. „Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii patogennych” („Analysis of the influence of rotating magnetic field on the effectiveness of antimicrobials against pathogenic bacteria”)
w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie biotechnologia

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Promotorem tej rozprawy jest dr hab. inż. Karol Fijałkowski, prof. ZUT.

Recenzję ww. pracy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pismo nr L.dz:WBiHZ/99/2023 z dnia 17 lipca 2023 r. przesłane przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Naukowej „Zootechnika i Rybactwo” dr hab. inż. Małgorzatę Ożgo, prof. ZUT.

Przedstawiona do oceny praca doktorska zawiera osiągnięcia opisane w trzech powiązanych tematycznie pracach eksperymentalnych opublikowanych w roku 2021 w otwartym dostępie (Open Access) w czasopismach MDPI, tj. w Pathogens (1 praca, D-1) oraz International Journal of Molecular Sciences (2 prace, D-2 i D-3) o sumarycznym współczynniku oddziaływania (impact factor) IF 16,947 i 380 pkt. MEiN. We wszystkich trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Swój udział oszacowała na 65% w pierwszej publikacji (7 autorów), 65% w drugiej (7 autorów) i 60% w trzeciej publikacji (9 autorów). Procentowy udział w realizacji tych publikacji przedstawiony przez Doktorantkę został w mojej ocenie nieco zawyżony (szczególnie w pracy D-3), gdyż są to prace wieloautorskie. Należy założyć, że dla osoby, której wkład w powstawanie publikacji był na tyle istotny, że została ona współautorem publikacji, należałoby

uwzględnić co najmniej 5% udział. Niemniej, ta uwaga nie umniejsza znacząco mojej bardzo dobrej całościowej opinii na temat przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Przedstawione badania miały charakter interdyscyplinarny i były realizowane we współpracy z ekspertami z różnych obszarów nauk inżynierskich, przyrodniczych oraz medycznych w ramach projektu finansowanego ze źródeł Narodowego Centrum Nauki (OPUS 14), którego Promotor był kierownikiem. Specyfika i wielowątkowość prowadzonych badań uzasadnia powstanie publikacji wieloautorских. Dzięki ogromnemu wsparciu merytorycznemu i dużemu doświadczeniu naukowemu dr. hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT, Pani mgr inż. Marta Woroszyło mogła uzyskać wiele wartościowych wyników o bardzo dużym potencjale aplikacyjnym. Przyczyniło się to do uzyskania pracy doktorskiej na bardzo wysokim poziomie naukowym. Należy podkreślić, że oprócz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Doktorantka jest również współautorem 4 publikacji z listy JCR. O dużej aktywności naukowej Pani mgr inż. Marty Woroszyło świadczy także Jej udział w realizacji projektów i zleceń badawczych jako wykonawca oraz udział w licznych konferencjach naukowych, szkoleniach i praktykach.

Problem badawczy

Tematyka badawcza podjęta przez mgr inż. Martę Woroszyło i zespół dr. hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT jest bardzo ważna i aktualna ze względu na duże zagrożenie zdrowia ludzi i zwierząt powodowane przez patogenne bakterie, ze szczególnym uwzględnieniem *Staphylococcus aureus*. Globalny problem rosnącej oporności bakterii patogennych na substancje przeciwdrobnoustrojowe, w tym antybiotyki, i wynikające z tego trudności w leczeniu infekcji spowodowanych wielolekoopornymi bakteriami, zmusza do intensywnego poszukiwania nowych alternatywnych metod terapeutycznych. Bardzo ciekawym i obiecującym podejściem w tym zakresie jest zastosowanie pola magnetycznego do wzmacniania efektów działania różnych środków przeciwdrobnoustrojowych. Z tych powodów tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę i zespół dr. hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT doskonale wpisuje się w aktualne potrzeby terapeutyczne.

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wszystkie wymogi formalne. Tytuł pracy w pełni odpowiada treściom w zawartym w rozprawie, a opisywane zagadnienia dotyczą aktualnych kierunków badań związanych z określeniem wpływu wirującego pola magnetycznego (WPM) na efekt działania antybiotyków wobec bakterii *S. aureus*, zarówno szczepów metycylinoopornych (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), jak i szczepów metycylinowrażliwych (methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA). W pracy opisano wyniki analiz mających na celu ustalenie wpływu WPM na różne parametry fizjologiczne badanych szczepów bakterii. Przedstawiona do oceny praca doktorska jest obszernym opracowaniem (185 stron),

które zawiera wszystkie wymagane elementy dla tego typu prac naukowych, tj.: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie do tematyki badawczej, hipotezy, cel pracy, syntetyczny opis wykorzystanych materiałów i metod badawczych oraz uzyskanych wyników, wnioski, spis cytowanej literatury, omówienie pozostałych osiągnięć naukowych, kopie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów publikacji. Z oświadczeń współautorów publikacji wynika, że wkład Doktorantki w wykonanie eksperymentów, analizę wyników i przygotowanie manuskryptów publikacji, wchodzących w skład pracy doktorskiej był dominujący (65% w pierwszej, 65% w drugiej i 60% w trzeciej pracy). Praca doktorska została przygotowana bardzo starannie i szczegółowo, zarówno pod względem naukowym, jak też graficznym i językowym, dzięki czemu czytało się ją z dużą przyjemnością.

Rozdział „Wprowadzenie” zawiera zwięzły opis (6 stron) własności szczepów MRSA i MSSA *S. aureus*, będących obiektem badań, w tym znaczenia tworzonego przez nie biofilmu dla trudności w eliminowaniu infekcji powodowanych przez te bakterie, jak również opis różnych rodzajów pól magnetycznych wykorzystywanych w badaniach z użyciem organizmów żywych. W mojej ocenie, podjęty temat badawczy jest bardzo ważny, gdyż *S. aureus* został zaklasyfikowany do grupy patogenów ESKAPE, ze względu na jego zdolność do szybkiej adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych (w tym również leków przeciwbakteryjnych i dezynfektantów) i występowanie w obrębie tego gatunku wielu szczepów wielolekoopornych. Doktorantka opisała w sposób zwięzły aktualny stan wiedzy w tym temacie wraz z cytowaniem licznej literatury, co jest bardzo dobrym wprowadzeniem do części eksperymentalnej pracy doktorskiej.

Podobnie hipotezy i cel pracy doktorskiej zostały sformułowane jasno i precyzyjnie. Doktorantka postanowiła zbadać (i) czy wpływ WPM na wybrane cechy fizjologiczne bakterii patogennych, takie jak: kinetyka wzrostu i aktywność metaboliczna, jest uzależniony od zróżnicowania szczepów w obrębie gatunku (publikacja D-1) i czy (ii) zwiększenie efektywności działania antybiotyków w obecności WPM względem bakterii *S. aureus* jest zależne od mechanizmu ich działania oraz stężenia, zróżnicowania szczepów w obrębie gatunku, a także od czasu ekspozycji i częstotliwości zastosowanego WPM (publikacje D-2 i D-3). Cel ten osiągnięto w pełni poprzez konsekwentną realizację licznych szczegółowych zadań, które dotyczyły ustalenia wpływu WPM na kinetykę wzrostu, morfologię, żywotność komórek *S. aureus* i ich aktywność metaboliczną w formie planktonicznej oraz w biofilmie, na efektywność działania antybiotyków wobec *S. aureus*, na uwalnianie antybiotyków z krążków bibułowych oraz ich dyfuzję w agarze, oceny zmian w efektywności działania antybiotyków wobec *S. aureus* preeksponowanych na WPM (efekt poeksponacyjny), jak też usystematyzowania sposobu prowadzenia analiz dotyczących wpływu PM na parametry funkcjonalne bakterii oraz efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych. Wybrany cel

badawczy był bardzo szeroko zakrojony, lecz mimo tego osiągnięto go w pełni, realizując konsekwentnie powiązane ze sobą zadania badawcze.

Rozdział „Materiały i metody” (6 stron) – ta część pracy została opisana przez Doktorantkę zwięźle ale wyczerpująco, ze wskazaniem jakie analizy były wykonywane we współpracy z innymi naukowcami. Podobnie rozdział „Wyniki” (5 stron) zawiera syntetyczny opis najważniejszych wyników uzyskanych w ramach tego osiągnięcia naukowego, które zostały skrupulatnie podsumowane w rozdziale „Wnioski”.

W mojej ocenie praca doktorska mgr inż. Marty Woroszyło jest bardzo wartościowym opracowaniem naukowym obejmującym kompleksową analizę wpływu WPM na różne aspekty fizjologiczne bakterii patogennych, w tym bardzo groźnej dla człowieka i zwierząt bakterii *S. aureus*. Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że badania w tym temacie nie były prowadzone w tak szerokim zakresie. W pierwszej pracy (**Pathogens 2021**), Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę aktualnego stanu wiedzy na temat wpływu różnych rodzajów pola magnetycznego na żywotność, wzrost i profil metaboliczny patogennych bakterii należących do różnych gatunków. W przeciwieństwie do analiz prowadzonych wcześniej przez innych naukowców, które dotyczyły tylko wybranych szczepów referencyjnych z danego gatunku bakterii, Doktorantka przeprowadziła analizy z użyciem większej liczby szczepów, tj. co najmniej 4 szczepy z każdego spośród 8 badanych gatunków bakterii: *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella catarrhalis* i *Bacillus cereus*, które różniły się pod względem budowy osłon komórkowych (bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne), kształtem komórek, ruchliwością oraz zdolnością do tworzenia spor. Doktorantka poczyniła bardzo ciekawe obserwacje wskazujące, że już tak niska wartość WPM jak 5 Hz powodowała zmiany we własnościach bakterii i dalsze zwiększanie WPM do 50 Hz nie wpływało drastycznie na zwiększenie efektów jego działania. Ponadto Doktorantka wykazała, że występuje duże zróżnicowanie efektów powodowanych przez WPM (pozytywne, negatywne lub brak efektu), nie tylko w odniesieniu do poszczególnych gatunków bakterii, ale także w dużym stopniu jest zależne od własności fizjologicznych poszczególnych szczepów bakterii. W mojej ocenie to bardzo interesujący i ważny wynik, potwierdzający zróżnicowaną wrażliwość różnych szczepów tego samego gatunku bakterii w stosunku do tego czynnika stresowego. Co ciekawe i bardzo istotne ze względów aplikacyjnych, to fakt, iż WPM wykazuje skuteczność działania już przy bardzo niskich wartościach (5 Hz) i krótkim czasie ekspozycji (pierwsze efekty były obserwowane już po 1 godz.). W związku z tym, mam pytanie do Doktorantki, jak można byłoby te informacje wykorzystać biotechnologicznie? Czy wykonując globalną analizę porównawczą między gatunkami bakterii Gram+ i Gram- można byłoby zaobserwować jakieś dodatkowe korelacje?

W kolejnym etapie prac mgr inż. Marta Woroszyło wraz z pozostałym zespołem badawczym postanowiła sprawdzić czy WPM wpływa na zmianę wrażliwości antybiotykowej metycylinoopornych szczepów *S. aureus*. W drugiej publikacji (**Int. J. Mol. Sci. 2021,22**), Doktorantka opisała uzyskane w tym

zakresie wyniki. Przy użyciu krążków bibułowych nasączonych antybiotykami o różnym mechanizmie działania oraz E-testów i technice pomiaru stref zahamowania wzrostu bakterii na płytkach z agarem (bakterie były potraktowane WPM 5 i 50 Hz), Doktorantka wykazała zwiększenie wrażliwości testowanych szczepów MRSA jedynie na antybiotyki β -laktamowe (tj. cefoksytynę, amoksylicynę i amoksyliny z kwasem klawulanowym), które powodują zahamowanie biosyntezy ściany komórkowej bakterii. Co ciekawe, podobne efekty zaobserwowano dla obu testowanych wartości WPM. Natomiast nie wykazano zbyt dużego wpływu WPM na ilość uwalnianych antybiotyków z krążków bibułowych w przypadku większości stosowanych związków. Obserwacje poczynione przez Doktorantkę sugerowały, iż WPM może działać na bakterie na etapie tworzenia osłon komórkowych. Dlatego logiczną konsekwencją tych działań było sprawdzenie działania WPM i jednego z przedstawicieli antybiotyków β -laktamowych (cefoksytyny) na integralność ściany komórkowej *S. aureus* w biofilmie. W mojej ocenie za szczególnie cenne uważam wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu mikroskopii konfokalnej i barwników specyficznych dla żywych i martwych komórek bakterii (SYTO-9 i jodek propidyny), które potwierdziły tę hipotezę i dodatkowo wykazały, że WPM negatywnie oddziałuje na ściany komórkowe bakterii, prowadząc do ich uszkodzenia, działając tym samym synergistycznie z antybiotykami β -laktamowymi. Informacje te mogłyby mieć zastosowanie w zwalczaniu infekcji wywołanych bakteriami *S. aureus*. W nawiązaniu do tej części badań mam pytanie do Doktorantki czy dostępne są w literaturze dane na temat wpływu WPM na produkcję polisacharydów powierzchniowych, hydrofobowość i potencjał elektrokinetyczny (zeta) komórek *S. aureus* i/lub innych bakterii patogennych? Czy znane są w literaturze dane na temat wpływu WPM na strukturę i/lub własności błon komórkowych bakterii? W mojej ocenie, są to ciekawe wątki badawcze, który w przyszłości mogłyby być włączone do badań przez Doktorantkę i zespół badawczy Promotora.

W dalszych etapach pracy, mgr inż. Marta Woroszyło kontynuowała z dużą konsekwencją i determinacją badania dotyczące różnych szczepów bakterii *S. aureus*. Efektem tych działań było uzyskanie wyników, które Doktorantka wraz z pozostałymi współautorami opisała w trzeciej publikacji (**Int. J. Mol. Sci. 2021,22**), wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego. W publikacji tej zawarto wyniki dotyczące efektów działania WPM i antybiotyków β -laktamowych na szczepy MRSA i MSSA. Doktorantka przebadła łącznie 28 szczepów i wykazała, że jednoczesne zastosowanie WPM i antybiotyków β -laktamowych powodowało zintensyfikowanie działania antybiotyku, obserwowane jako zahamowanie strefy wzrostu bakterii i obniżenie wartości MIC antybiotyku. Analizy mikroskopowe z użyciem technik TEM i SEM wykazały, że oddziaływanie WPM na komórki bakterii skutkowało zmianą morfologii komórek (tj. kształtu, gęstości ściany komórkowej i kondensacji cytoplazmy). Chciałam podkreślić, iż Pani Marta Woroszyło poczyniła bardzo ciekawe i ważne obserwacje w tym temacie w kontekście przyszłych zastosowań biotechnologicznych; wykazała bowiem większą efektywność działania antybiotyków β -laktamowych w obecności WPM w stosunku do szczepów MRSA w porównaniu do efektów uzyskanych w warunkach

kontrolnych. Chciałabym zapytać Doktorantkę jakie widziałaby potencjalne zastosowania praktyczne swoich osiągnięć naukowych przedstawionych w pracy doktorskiej i które z uzyskanych przez siebie wyników uważa za najważniejsze lub najciekawsze?

Podsumowując, mgr inż. Marta Woroszyło w ramach przedstawionej pracy doktorskiej, stanowiącej cykl trzech publikacji, uzyskała bardzo dużo ciekawych i wartościowych wyników, dotyczących wpływu WPM na własności i funkcjonowanie bakterii patogennych oraz skuteczność działania różnych antybiotyków. Należy docenić ilość pracy włożonej przez mgr inż. Martę Woroszyło w uzyskanie przedstawionych wyników. Doktorantka osobiście wykonała wiele eksperymentów i analiz z użyciem licznych szczepów bakteryjnych i metod mikrobiologicznych oraz biochemicznych. Przetestowała wiele wariantów, stosując różne wartości WPM, szeroki zakres czasu ekspozycji, wiele antybiotyków o różnych mechanizmach działania, wpływ WPM na dyfuzję i działanie antybiotyków oraz określiła różne parametry funkcjonalne bakterii w tych warunkach, takie jak: kinetykę wzrostu, żywotność i aktywność metaboliczną komórek, kształt i topologię ścian bakterii patogennych. W swoich badaniach Doktorantka skupiła się głównie na modelu badawczym, jakim była Gram-dodatnia bakteria *S. aureus*. Prowadzenie badań wykorzystując tak trudny materiał biologiczny, jakim są bakterie, wymaga wykonania bardzo dużej liczby powtórzeń i przeanalizowania wielu prób, co jest zadaniem bardzo czasochłonnym. Doktorantka świetnie sobie poradziła z tym problemem, czego dowodem jest uzyskanie wyników o dużej powtarzalności (świadczą o tym niskie wartości SD) i istotności statystycznej. Dzięki staranności i dokładności prowadzonych badań, Doktorantka mogła zaobserwować różnice między testowanymi wariantami i wyciągnąć ciekawe i ważne wnioski.

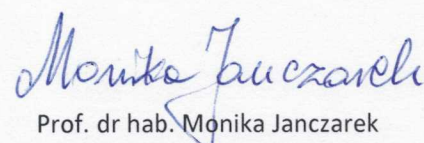
W konkluzji recenzji, chciałabym pokreślić szeroki zakres prac przeprowadzonych przez mgr inż. Martę Woroszyło, czasochłonność eksperymentów z użyciem wielu licznych preparatów mikrobiologicznych oraz testowanych wariantów. Dzięki pracowitości, wytrwałości i dużemu zaangażowaniu Doktorantka otrzymała dużą ilość interesujących i wartościowych wyników, które przyczyniły się do zwiększenia naszej wiedzy na temat mechanizmów działania WPM na bakterie patogenne oraz wpływu tego czynnika stresowego na działanie różnych związków przeciwdrobnoustrojowych. Dzięki osiągnięciom naukowym Doktorantki zastosowanie WPM może w przyszłości przyczynić się do lepszego wykorzystania antybiotyków β -laktamowych w zwalczaniu infekcji spowodowanych szczepami wielolekoopornymi.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marty Woroszyło stanowi samodzielną i wyodrębnioną część pracy zbiorowej, składającej się z trzech publikacji naukowych spójnych pod względem tematycznym oraz prowadzonych badań. Dominujący udział Doktorantki w realizacji tych zadań badawczych został potwierdzony przez Nią oraz w oświadczeniach pozostałych Współautorów publikacji. Z tych powodów, z

pełnym przekonaniem stwierdzam, że osiągnięcie naukowe Pani mgr inż. Marty Woroszyło **spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim** (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, Dz.U. z 2018 r., poz. 261, poz. 1669) przede wszystkim ze względu na: (i) aktualny problem naukowy, którego rozwiązanie jest istotne dla poprawy leczenia infekcji spowodowanych wielolekoopornymi bakteriami patogennymi, (ii) dostarczenie nowej wiedzy w temacie wpływu wirującego pola magnetycznego na morfologię i funkcjonowanie komórek bakterii patogennych, (iii) odkrycie synergistycznego działania WPM i antybiotyków β -laktamowych wobec bakterii. Doktorantka jasno i precyzyjnie określiła cel swoich badań, zoptymalizowała stosowane parametry i warunki hodowlane bakterii, precyzyjnie wykonała analizy mikrobiologiczne i biochemiczne dla ogromnej liczby próbek biologicznych i testowanych wariantów badawczych. Uważam, że Doktorantka opanowała w wymaganym zakresie warsztat badawczy niezbędny do rozwiązywania problemów naukowych w dziedzinie nauk rolniczych. Doktorantka potwierdziła swoimi osiągnięciami i aktywnością naukową, że jest przygotowana do prowadzenia wieloaspektowych zadań badawczych. W związku z powyższym, składam wnioski do Rady Dyscypliny Naukowej „Zootechnika i Rybactwo” Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Woroszyło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na bogaty materiał analityczny zastosowany w pracy, szeroki zakres przeprowadzonych badań mikrobiologicznych i biochemicznych, ogrom włożonej pracy oraz uzyskanie przez Doktorantkę wartościowych wyników o charakterze poznawczym i aplikacyjnym, w mojej ocenie osiągnięcia zawarte w rozprawie doktorskiej należy uznać za wyróżniające się. Biorąc pod uwagę również fakt bezpośredniego zaangażowania Doktorantki w analizę i opracowanie uzyskanych danych oraz przygotowanie manuskryptów oraz opublikowania wszystkich wyników w wysokopunktowanych czasopismach o sumarycznym IF 16,947 i 380 pkt. MEiN **wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej** mgr inż. Marty Woroszyło stosowną Nagrodą przez Radę Naukową „Zootechnika i Rybactwo” Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.


Prof. dr hab. Monika Janczarek