

**Xymena Stachurska**

**Rozprawa doktorska**

**WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH NA  
AKTYWNOŚĆ BAKTERIOLITYCZNĄ BAKTERIOFAGÓW**

## **Streszczenie**

Głównym celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriologiczną bakteriofagów, mając przede wszystkim na uwadze interakcje pomiędzy tymi czynnikami. Przewidywano obecność interakcji o różnym charakterze – synergistycznym i antagonistycznym, a także brak obecności znaczących oddziaływań.

W ramach tematu rozprawy, podjęto trzy wątki badawcze odpowiadające trzem wybranym rodzajom czynników przeciwdrobnoustrojowych. Czynniki te obejmowały antybiotyki, nanomateriały oraz ekstrakty roślinne w połączeniu z bakteriofagami litycznymi. Obrane wielokierunkowe podejście badawcze miało na celu określenie, czy dane czynniki przeciwdrobnoustrojowe mają potencjał koaplikacyjny z fagami litycznymi – czyli czy istnieje możliwość ich jednoczesnej aplikacji w ramach łączonej terapii antybakteryjnej.

Wraz z odkryciem fenomenu synergii działania niektórych antybiotyków i fagów litycznych (ang. phage-antibiotic synergy, PAS), środowisko naukowe zainteresowało się badaniami interakcji wyżej wymienionych czynników, co zaowocowało pojawieniem się znacznej ilości publikacji naukowych o tej tematyce w relatywnie krótkim czasie. Podczas studiowania literatury pod kątem planowania badań dysertacji doktorskiej, zauważono jednak brak ujednoczenia metody wstępnego wykrywania PAS – w wielu pracach posługiwano się techniką podwójnej warstwy agarowej na płytkach Petriego (double-layer agar, DLA), jednakże sposób aplikacji antybiotyków różnił się umiejscowieniem: od dodawania czynnika w postaci krążków na warstwę górną agaru, po mieszanie go z agarą dolną. Ta obserwacja pozwoliła na zaplanowanie pierwszych badań dysertacji, których celem było określenie najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy, pozwalającej na wykrycie połączeń fag-antybiotyków o potencjale synergistycznym [D-1]. Do badań użyto litycznego bakteriofaga typu T4 oraz 43 antybiotyki należące do różnych grup. Przetestowano siedem różnych modyfikacji metody DLA, pod względem miejsca aplikacji antybiotyku oraz obecności lub braku agaru dolnego. W badaniach wykazano, że całkowita liczba łysek fagowych na płytkach zależała głównie od zastosowanego antybiotyku. Różnice w ilości łysek zależały od rodzaju modyfikacji metody DLA. Udowodniono, że w celu najlepszej wizualizacji efektu PAS, najlepsze wyniki dostarczyła modyfikacja z użyciem krążków antybiotykowych, w której nastąpiło ogólne zwiększenie zróżnicowania średnic łysek fagowych w wyniku aplikacji antybiotyku bezpośrednio na górną warstwę agaru w obecności agaru dolnego, co mogło wynikać przede wszystkim z powolnej dyfuzji antybiotyku do strefy wzrostu bakterii. Natomiast największą łączną liczbę łysek uzyskano przez dodanie antybiotyku do agaru dolnego z obecnością agaru górnego. Wskazuje to, że chociaż antybiotyk mógłby wykazywać efekt PAS standardową metodą krążkową, warto byłoby zbadać, czy efekt jest równie zadowalający przy aplikacji antybiotyków bezpośrednio do

agaru dolnego, w odniesieniu do użycia tego samego bakteriofaga i gospodarza bakteryjnego [D-1].

Badania naukowe podejmujące temat nanomateriałów i bakteriofagów w głównej mierze analizowały możliwość i znaczenie tworzenia nanomateriałów z części składowych lub nawet całych struktur fagowych. Z uwagi na brak literatury opisującej interakcje bakteriofagów i nanomateriałów (traktując nanomateriały jako drugi, autonomiczny czynnik przeciwdrobnoustrojowy), zdecydowano się na przeprowadzenie pionierskich badań mających na celu eksperymentalne określenie ich możliwości koaplikacyjnych jako część niniejszej dysertacji [D-2]. W pracy użyto litycznego bakteriofaga typu T4 oraz sześć różnych nanomateriałów w postaci nanocząstek (ang. nanoparticles, NP):  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$  i  $\text{SiO}_2\text{-Fe}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ . W publikacji szczegółowo zbadano: zdolność faga do tworzenia łysek, wydajność lityczną faga, czas powstania plonów fagowych oraz ich miana na podstawie oznaczeń fazy eklipsy. Wykazano, że obrazowanie za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) oraz wyniki potencjałów zeta nanocząstek (ZP) były kluczowe dla wyjaśnienia uzyskanych danych mikrobiologicznych. Podczas interpretacji wyników zaproponowano hipotezę zakładającą, że sama obecność ładunku nanocząstek nie jest wystarczająca, aby bakteriofag adherował w sposób uporządkowany i specyficzny do nanocząstek, w konsekwencji wpływając na wydajność faga. Największy wpływ na obserwowane interakcje miały wartości potencjałów zeta nanocząstek. Wartości graniczne ZP ustalono przy:  $\text{ZP} < -35$  (mV) dla efektu wiązania ogonka fagowego i  $\text{ZP} > 35$  (mV) dla wiązania główki fagowej. Kiedy nanocząstki nie spełniały tych wymagań, fizyczne oddziaływania fag-nanocząstka stają się niespecyficzne. Wykazano również, że nanocząstki wpływały na aktywność lityczną faga, niezależnie od ich zastosowanego stężenia. Większość badanych nanocząstek pozytywnie wpłynęła na wydajność lityczną faga, z wyjątkiem  $\text{SiO}_2$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ , o potencjale ZP niższym niż 35 (mV), wiążąc się z ogonkiem fagowym [D-2].

Antybakteryjne działanie ekstraktów roślinnych jest tematem cieszącym się niesłabnącym zainteresowaniem ze strony środowiska naukowego, często opisywanym w literaturze fachowej. Jednakże publikacje opisujące wpływ ekstraktów na bakteriofagi lityczne jest wątkiem podejmowanym stosunkowo rzadko, a dostępne prace są w dużej mierze nieaktualne, więc wykorzystują również metody bardzo podstawowe i niedokładne. Jeszcze rzadziej można napotkać badania przedstawiające wyniki połączenia ekstraktów roślinnych i fagów w środowisku bakteryjnym, dlatego też postanowiono przeprowadzić analizy interakcji tych wieloczynnikowych mieszanin, wykorzystując wiele nowoczesnych metod badawczych [D-3, nieopublikowana praca B-1]. W badaniach wykorzystano referencyjne bakteriofagi lityczne (MS2, T4 i phi6) i metanolowe ekstrakty roślinne, pozyskane z ziela jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*) i ruty (*Ruta graveolens*). Ze względu na złożoność oddziaływań, przeprowadzono następujące eksperymenty: ocenę wpływu ekstraktów roślinnych na komórki gospodarzy bakteryjnych metodą mikrorozcieńczeń, ocenę wpływu ekstraktów roślinnych na aktywność i zdolność łysek fagów metodą koinkubacji, synografie oddziaływań statycznych ekstraktów roślinnych i fagów w środowisku gospodarzy bakteryjnych, profile lizy fagowej podczas oddziaływań dynamicznych badanych mieszanin w bioreaktorach oraz wizualizację wpływu ekstraktów roślinnych i fagów na komórki gospodarzy bakteryjnych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). W badaniach wykazano obecność interakcji antagonistycznych: ekstrakty z jeżówki purpurowej i ruty wykazywały działanie antyfagowe i bakteriobójcze. Udowodniono, że wpływ niskich stężeń ekstraktu na mikroorganizmy zależał od gatunków testowanych fagów i gospodarzy bakteryjnych, podczas gdy wysokie stężenia generalnie hamowały lizę bakteryjną. Co więcej, interakcje obserwowane w środowisku statycznym różniły się od tych przeprowadzonych w środowisku dynamicznym, co wskazało na kluczowe znaczenie wykonywania wielu analiz podczas badania tak złożonych mieszanin [D-3].

29.06.2023r. Xymena Steclike