

Olsztyn, dnia 3 stycznia 2023 roku

Dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni
Katedra Mikrobiologii i Mykologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 1A
10-719 Olsztyn

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Darii Cicholewskiej-Juśko
pt. „Opracowanie i charakterystyka materiałów bionanocelulozowych do
zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji
biofilmów bakteryjnych”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Darii Cicholewskiej-Juśko pt. „Opracowanie i charakterystyka materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych” została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod opieką naukową Pana dra hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT. Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo z dnia 10 listopada 2022 roku Pana dra hab. inż. Arkadiusza Pietruszki, prof. ZUT, Dziekana Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (pismo nr L.dz: WBiHZ/160/2022).

1. Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl czterech, spójnych tematycznie artykułów opublikowanych w latach 2021 i 2022 w renomowanych czasopismach naukowych z zakresu biotechnologii oraz mikrobiologii indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports*:

1. **Ciecholewska-Juśko, D.**, Żywicka, A., Junka, A., Drozd, R., Sobolewski, P., Migdał, P., Kowalska, U., Toporkiewicz, M., Fijałkowski, K. (2021). Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117247.
2. **Ciecholewska-Juśko, D.**, Broda, M., Żywicka, A., Styburski, D., Sobolewski, P., Gorący, K., Migdał, P., Junka, A., Fijałkowski, K. (2021). Potato juice, a starch industry waste, as a cost-effective medium for the biosynthesis of bacterial cellulose. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10807.

3. **Ciecholewska-Juško, D.**, Junka, A., Fijałkowski, K. (2022). The crosslinked bacterial cellulose impregnated with octenidine dihydrochloride-based antiseptic as an antibacterial dressing material for highly-exuding, infected wounds. *Microbiological Research*, 263, 127125.
4. **Ciecholewska-Juško, D.**, Żywicka, A., Junka, A., Woroszyło, M., Wardach, M., Chodaczek, G., Szymczyk-Ziółkowska, P., Migdał, P., Fijałkowski, K. (2022). The effects of rotating magnetic field and antiseptic on in vitro pathogenic biofilm and its milieu. *Scientific reports*, 12(1), 1-19.

Liczba punktów za publikacje stanowiące rozprawę doktorską (według Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 1 grudnia 2021r.) wynosi 520, natomiast Impact Factor (IF) wynosi 25,099. Powyższe parametry naukometryczne świadczą o wysokiej wartości naukowej przedłożonej do oceny dysertacji.

Oryginalne prace badawcze składające się na rozprawę zostały opatrzone 44-stronicowym omówieniem zawierającym: streszczenie (w języku polskim oraz angielskim), wprowadzenie, hipotezy oraz cel pracy, krótki opis stosowanych metod i uzyskanych wyników, wnioski jak również bibliografię wykorzystaną do przygotowania wyżej wymienionego omówienia i opis dorobku naukowego Doktorantki. Ponadto, do pracy dołączono oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opisujące ich udział w powstaniu wyżej wymienionego cyklu publikacji. Z dołączonych do dysertacji oświadczeń wynika, że Doktorantka brała udział w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, poddała analizie i zinterpretowała uzyskane wyniki oraz przygotowała manuskrypty. We wszystkich publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia Pani mgr inż. Daria Cicholewska-Juško jest pierwszym autorem co świadczy o jej wiodącej roli w ich powstanie.

2. Ocena zasadności wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Doktorantka podjęła się trudnej tematyki związanej z opracowaniem oraz charakterystyką materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych. Zakażenia ran przewlekłych stanowią poważny i narastający problem współczesnej medycyny. Mogą się one pojawić na każdym etapie procesu gojenia spowalniając ten proces oraz stając się zagrożeniem dla życia pacjenta. Środowisko ran przewlekłych jest bogate w składniki odżywcze stanowiąc tym samym idealne warunki dla rozwoju mikroorganizmów posiadających zdolność tworzenia biofilmu. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się opracowaniu innowacyjnych terapii przeciwdrobnoustrojowych, które nie tylko mogą pozytywnie wpłynąć na proces rekonwalescencji pacjentów, ale również mogą przyczynić się do obniżenia kosztów związanych z opieką medyczną. Szczególnie ważne są badania zmierzające do opracowania nowoczesnych opatrunków przeciwdrobnoustrojowych, które w znacznym stopniu ograniczą adhezję drobnoustrojów i obniżą ich liczebność w ranie do bezpiecznego poziomu. Celuloza bakteryjna (BC) ze względu na unikalne właściwości jest atrakcyjnym biopolimerem do zastosowań w aplikacjach medycznych, jednakże potencjał tego innowacyjnego materiału nie

jest w pełni wykorzystany. Ze względu na fakt, że BC jest dobrym bionośnikiem substancji czynnych może być stosowana jako materiał opatrunkowy na przewlekłe rany. Tematyka przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest więc związana z niezwykle ważnym zagadnieniem poszukiwania nowatorskiej metody leczenia przewlekłych ran zainfekowanych przez mikroorganizmy tworzące biofilm. Problematyka pracy doktorskiej jest nowatorska, a jej realizacja poszerzyła dotychczasową wiedzę z zakresu opracowania nowoczesnych opatrunków oraz stanowi rozwiązanie oryginalnego problemu badawczego. Postawiony cel naukowy jest aktualny i odpowiada poziomowi jakim powinna odznaczać się rozprawa doktorska.

3. Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią wartościowe uzupełnienie prac badawczych prowadzonych przez Zespół dra hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT oraz innych badaczy. W celu weryfikacji prawidłowo sformułowanych hipotez oraz celu rozprawy Pani mgr inż. Daria Ciecholewska-Juško przeprowadziła szereg eksperymentów stosując szeroki zakres metod badawczych, dzięki czemu otrzymane wyniki i wnioski są jak najbardziej przekonujące, a ich dobór świadczy o niezwyklej rzetelności Doktorantki.

Publikacja 1: *Ciecholewska-Juško, D., Żywicka, A., Junka, A., Drozd, R., Sobolewski, P., Migdał, P., Kowalska, U., Toporkiewicz, M., Fijałkowski, K. (2021). Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. Carbohydrate Polymers, 253, 117247.*

W pierwszej pracy składającej się na rozprawę doktorską, mgr inż. Daria Ciecholewska-Juško opracowała oraz zoptymalizowała proces modyfikacji celulozy bakteryjnej w wyniku reakcji krzyżowego sieciowania oraz różnych wariantów katalizatorów w celu poprawy zdolności sorpcyjnych tego biomateriału w stanie suchym. Etap ten był ważny, z uwagi na fakt, że odpowiednie właściwości absorpcji i utrzymania cieczy determinują zastosowanie materiału jako nośnika dla związków przeciwdrobnoustrojowych. Wyniki badań potwierdziły wyższe współczynniki pęcznienia oraz utrzymania wody BC po modyfikacji, niezależnie od zastosowanego wariantu eksperymentalnego, w porównaniu z niemodyfikowaną BC. Co najważniejsze, Doktorantka porównała chłonność otrzymanych materiałów z komercyjnie dostępnymi opatrunkami stosowanymi na rany z dużym wysiękiem wykazując wyższą powierzchnię wodną modyfikowanej BC aniżeli opatrunków dostępnych na rynku. Jednakże, w rozdziale „Materiały i metody” brakuje informacji o nazwach oraz firmie produkującej testowane opatrunki. Czy produkty te były badane pod względem ich właściwości mechanicznych, cytotoksyczności czy też aktywności przeciwdrobnoustrojowej? Czy parametry te były porównywalne do tych wykazanych w toku badań nad celulozą bakteryjną stosowaną przez Doktorantkę? Dodatkowo, chciałabym prosić o uzupełnienie informacji dotyczących sposobu konserwacji szczepu produkującego BC należącego do gatunku *Komagataeibacter xylinus* zakupionego z Amerykańskiej Kolekcji Mikroorganizmów. Czy przed przeprowadzeniem hodowli produkcyjnej została przeprowadzona hodowla inokulacyjna? Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka wybierając stężenia czynnika sieciującego oraz katalizatora? Doktorantka wykazała również obecność śladowych stężeń sodu lub fosforu na modyfikowanej celulozie bakteryjnej, a wartości te różniły się w zależności od zastosowanego

wariantu eksperymentalnego. Czy pierwiastki te mogły mieć wpływ na analizowane właściwości sorpcyjne oraz otrzymane wyniki cytotoksyczności?

Publikacja 2: *Ciecholewska-Juśko, D., Broda, M., Żywicka, A., Styburski, D., Sobolewski, P., Gorący, K., Migdał, P., Junka, A., Fijałkowski, K. (2021). Potato juice, a starch industry waste, as a cost-effective medium for the biosynthesis of bacterial cellulose. International Journal of Molecular Sciences, 22(19), 10807.*

W drugiej publikacji składającej się na rozprawę doktorską, mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko, opracowała pożywkę produkcyjną na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków jako jedyne źródła składników odżywczych w hodowli *K. xylinus*. Zastosowanie powyższego medium hodowlanego było uzasadnione z ekonomicznego oraz ekologicznego punktu widzenia. Otrzymane wyniki potwierdziły, że wydajność produkcji BC była zależna od zastosowanego szczepu *K. xylinus*, w przypadku 4 szczepów opracowana pożywka nie zapewniała optymalnej wydajności produkcji celulozy bakteryjnej. W badaniach własnych Doktorantka zastosowała odmianę ziemniaka „Tajfun”. Czy w opinii Doktorantki odmiana ziemniaka może mieć wpływ na stężenie oraz właściwości otrzymanego BC? Ponadto, aby oszacować korzyści ekonomiczne wynikające z zastosowania pożywki z bulw ziemniaków Doktorantka przeprowadziła próbę kalkulacji zakładającą zastosowanie ww. medium hodowlanego jako surowca do produkcji BC. Czy Doktorantka mogłaby podjąć próbę oszacowania kosztu celulozy bakteryjnej (bioproduktu końcowego) otrzymanej na pożywce na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków? Dodatkowo, Doktorantka wskazała na możliwość pozyskania soku komórkowego z ziemniaków będących odpadami przemysłu skrobiowego. Czy w opinii Doktorantki pożywka taka charakteryzowałaby się takimi samymi parametrami składników odżywczych w porównaniu z czystym wariantem? Czy odpad ten nie będzie cechował się obecnością trudnych do usunięcia cząstek stałych, które negatywnie wpłynęłyby na proces oczyszczania BC, a w konsekwencji limitowałyby jej praktyczne zastosowanie? W powyższej publikacji Doktorantka opisała również wyniki analiz aktywności przeciwdrobnoustrojowej BC otrzymanej zarówno z hodowli z pożywką odpadową jak również tej uzyskanej w pożywce Hestrin-Schramm. W tym celu wysycono nanomateriały 1 mL antyseptyku na bazie dichlorowodoru oktenidyny dostępnego komercyjnie. Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka wybierając powyższą objętość antyseptyku?

Publikacja 3: *Ciecholewska-Juśko, D., Junka, A., Fijałkowski, K. (2022). The crosslinked bacterial cellulose impregnated with octenidine dihydrochloride-based antiseptic as an antibacterial dressing material for highly-exuding, infected wounds. Microbiological Research, 263, 127125.*

W trzeciej publikacji składającej się na rozprawę doktorską, mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko, oszacowała potencjał BC jako materiału opatrunkowego skierowanego przeciwko biofilmom tworzonym przez *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) oraz *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15542). Ponadto aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanego materiału badano względem klinicznych izolatów gronkowców należących do gatunków *S. aureus*, *S. equorum*, *S. warneri*, *S. xylosus*, a także do gatunku *P. aeruginosa*. Izolaty kliniczne pochodziły z kolekcji mikroorganizmów Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii ZUT. Z uwagi na fakt, że bakterie nabywają oporności na antybiotyki, stosowanie środków antyseptycznych stało się powszechne w terapii i profilaktyce miejscowych zakażeń związanych z biofilmem.

Dlatego też nasuwa się pytanie czy izolaty kliniczne wykorzystane w badaniach charakteryzowały się opornością na antybiotyki? Dodatkowo na szczególne uznanie zasługuje opracowanie przez Doktorantkę modelu łożyska rany, co wciąż stanowi duże wyzwanie dla badaczy.

Publikacja 4: Ciecholewska-Juśko, D., Żywicka, A., Junka, A., Woroszyło, M., Wardach, M., Chodaczek, G., Szymczyk-Ziółkowska, P., Migdał, P., Fijałkowski, K. (2022). *The effects of rotating magnetic field and antiseptic on in vitro pathogenic biofilm and its milieu. Scientific reports, 12(1), 1-19.*

W czwartej publikacji składającej się na rozprawę doktorską, mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko, podjęła próbę analizy wpływu wirującego pola magnetycznego (RMF) na uwalnianie antyseptyku z nośnika na bazie suchej, niemodyfikowanej BC i jego penetrację przez warstwy biofilmu tworzonego przez *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) oraz *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15542). Przeprowadzenie tego etapu badawczego jest uzasadnione, z uwagi na zdolność biofilmu do odbudowania struktury w krótkim czasie nawet po procesie konwencjonalnego leczenia. Otrzymane wyniki potwierdziły wzrost stopnia uwalniania zastosowanego antyseptyku na bazie OCT oraz jego penetracji przez kolejne warstwy badanego biofilmu pod wpływem RMF. Jednakże, brakuje informacji na temat sposobu przechowywania szczepów stosowanych do przygotowania biofilmów? Czy metoda konserwacji szczepów ma wpływ na ewentualną utratę przez nie cech związanych z wirulencją?

Wyniki badań prezentowanych w powyższych pracach eksperymentalnych można zaliczyć do badań podstawowych, niemniej jednak mają one przede wszystkim wymiar aplikacyjny z potencjałem do wykorzystania w przyszłości w praktyce. Dane przedstawione w tych publikacjach mają charakter nowatorski. Przedłożone do oceny prace stanowią logiczną całość, ich cele badawcze zostały jasno sprecyzowane, analiza otrzymanych wyników jest satysfakcjonująca, a dyskusja została przeprowadzona w sposób prawidłowy.

W skład przedłożonej rozprawy doktorskiej, oprócz kopii publikacji, wchodzi również manuskrypt będący autorskim opracowaniem Doktorantki. W rozdziale „Wprowadzenie” Doktorantka w sposób przekonujący uzasadniła celowość podjęcia tematyki badawczej. W bardzo oszczędny sposób opisała dotychczasowy stan wiedzy z zakresu problematyki dysertacji, co budzi mój niedosyt. W moim odczuciu brakuje informacji o szlakach metabolicznych zaangażowanych w proces produkcji BC. Informacja ta jest ważna, z uwagi na fakt stosowania przez Doktorantkę różnych pożywek produkcyjnych: pożywka z soku komórkowego bulw ziemniaka oraz podłoże Hestrin-Schramm. W kolejnych rozdziałach precyzyjnie sformułowano hipotezy badawcze oraz postawiono cel rozprawy wraz z celami szczegółowymi. Jednakże, rozdział „Materiały i metody badawcze” został skrótowo opisany. Brakuje informacji dotyczących między innymi: sposobu konserwacji stosowanych szczepów, badania czystości hodowli podczas prowadzonych procesów, liczby powtórzeń biologicznych, danych dotyczących gęstości optycznej/liczby komórek *S. aureus* oraz *P. aeruginosa* stosowanych w analizach żywotności bakterii, stężenia roztworów OCT do impregnacji BC. Dodatkowo nieprecyzyjnie nazwano zastosowany antyseptyk – poprawniej byłoby zamiast „antyseptyk dichlorowodorek oktenidyny”, „antyseptyk na bazie dichlorowodoru oktenidyny”, jest to produkt dostępny komercyjnie, który oprócz wspomnianego związku zawiera w składzie inne substancje. Rozdział „Wyniki” został bardzo dobrze opracowany,

czytelnie opisano poszczególne etapy badawcze oraz otrzymane wyniki. Opisując Etap 2 prac eksperymentalnych Doktorantka wspomniała o badaniu 25 odmian ziemniaków jako potencjalnych surowców do przygotowania pożywki produkcyjnej do wytwarzania BC z wykorzystaniem różnych szczepów *K. xylinus* i różnych warunków hodowli. Jednakże, w publikacji D-2 nie ma opisu tej części prac badawczych, Doktorantka napisała, że wykorzystwała jedynie odmianę ziemniaka „Tajfun” jako pożywkę produkcyjną. Z czego wynika ta rozbieżność? Opracowanie zamyka rozdział „Wnioski”, który potwierdza, że postawione cele pracy zostały zrealizowane i stanowią istotny wkład w poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat możliwości zastosowania materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych.

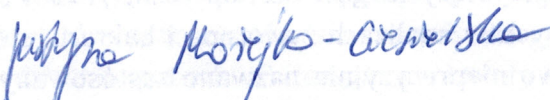
4. Podsumowanie i konkluzja końcowa

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko uważam, że uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i wartościowe. Stanowią one nie tylko wartość poznawczą, ale są również podstawą do planowania i prowadzenia dalszych doświadczeń naukowych. Przedstawione, powyższe spostrzeżenia nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej. Pytania opisane powyżej, które nasunęły mi się po lekturze manuskryptu będącego autorskim opracowaniem Doktorantki oraz publikacji wchodzących w skład rozprawy wydają się być dobrym punktem do rozpoczęcia dyskusji podczas obrony dysertacji.

Chciałabym podkreślić, że jestem pod dużym wrażeniem dorobku naukowego Doktorantki obejmującego liczne publikacje naukowe, doniesienia konferencyjne, patent oraz zgłoszenia patentowe, udział w projektach badawczych. Bez wątplenia jest ona zaangażowanym młodym naukowcem z dużym potencjałem badawczym. W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest dowodem dojrzałości naukowej Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko oraz Jej wyróżniającego przygotowania merytorycznego i warsztatowego.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko pt. „Opracowanie i charakterystyka materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych” spełnia warunki 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 2017 r. poz. 1789) – zgodnie z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z powyższym, wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową oraz aplikacyjną wyników opublikowanych w prestiżowych czasopiśmie naukowych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni