

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 bakteriolityczną 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 ujednolicenia 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 dolnym. Ta obserwacja pozwoliła na zaplanowanie pierwszych badań dysertacji, których celem było określenie najefektywniejszej modyfikacji metody podwójnej warstwy, pozwalającej na wykrycie połączeń fag-antybiotyk 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 łysinek fagowych na płytkach zależała głównie od zastosowanego antybiotyku. Różnice w ilości łysinek 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 łysinek 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 łysinek 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): SiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$, TiO_2 , Fe_3O_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 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 nielubianym 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].

28.06.2023r. Xymena Steclike

Xymena Stachurska

Doctoral dissertation

**THE INFLUENCE OF SELECTED ANTIMICROBIAL FACTORS ON
BACTERIOLYTIC ACTIVITY OF BACTERIOPHAGES**

Abstract

The main objective of the doctoral dissertation was to determine the effect of selected antimicrobial agents on the bacteriolytic activity of bacteriophages, taking into account the interactions between these agents. The presence of interactions of various nature - synergistic and antagonistic, as well as the absence of significant interactions - was predicted.

As part of the dissertation topic, three research trends were undertaken, corresponding to three selected types of antimicrobial agents. These trends included antibiotics, nanomaterials and plant extracts combined with lytic bacteriophages. The chosen multidirectional research approach was aimed at determining whether the given antimicrobial agents have co-application potential with lytic phages, i.e. whether there is a possibility of their simultaneous application as part of combined antibacterial therapy.

With the discovery of the phenomenon of synergistic action of some antibiotics and lytic phages (phage-antibiotic synergy, PAS), the scientific community became interested in research on the interactions of the above-mentioned factors, which resulted in the appearance of a large number of scientific papers on this subject in a relatively short time. While studying the literature in terms of planning research for presented doctoral dissertation, the lack of unification of the method for the initial detection of PAS was noticed - in many papers the technique of double-layer agar on Petri dishes (DLA) was used, but the method of application of antibiotics differed in its' location: from adding antibiotics in the form of disks on the top agar layer, to mixing them with the bottom agar. This observation made it possible to plan the first dissertation studies, the aim of which was to determine the most effective modification of the double-layer agar method, allowing the detection of phage-antibiotic combinations with synergistic potential [D-1]. The lytic T4-like bacteriophage and 43 different antibiotics belonging to various classes were used in the study. Seven different modifications of the DLA method were tested in terms of the antibiotic application placement and the presence or absence of bottom agar. The studies showed that the total number of phage plaques on the plates depended mainly on the antibiotic used. Differences in the number of plaques depended on the type of modification of the DLA method. It was proved that in order to best visualize the PAS effect, the best results were obtained by the modification with the use of antibiotic disks, in which there was a general increase in the diversity of phage plaque diameters as a result of the application of the antibiotic directly to the top agar layer in the presence of the bottom agar, which could be primarily due to slow diffusion of the antibiotic to the bacterial growth zone. However, the highest total number of plaques was obtained by adding the antibiotic to the bottom agar with the presence of the top agar. This indicates that although the antibiotic could show the PAS effect by the standard disk method, it would be worth investigating whether the effect is equally satisfactory when applying antibiotics directly to the bottom agar, in relation to the use of the same bacteriophage and bacterial host [D-1].

Scientific research dealing with the topic of nanomaterials and bacteriophages mainly analyzed the possibility and applicability of creating nanomaterials from components or even entire phage structures. Due to the lack of literature describing the interaction of bacteriophages and nanomaterials (treating nanomaterials as a second, autonomous antimicrobial agent), it was decided to conduct innovative research aimed at experimentally determining their co-application capabilities as part of this dissertation [D-2]. The lytic bacteriophage T4-like and six different nanomaterials in the form of nanoparticles (NP) were used in this work: SiO₂, TiO₂-SiO₂, TiO₂, Fe₃O₄, Fe₃O₄-SiO₂ and SiO₂-Fe₃O₄-TiO₂. In the paper it was examined in detail: the plaque-forming ability of the phage, phage lytic efficiency, the time of phage progeny formation and their titers based on the determination of their eclipse phases. Transmission electron microscopy (TEM) imaging and nanoparticle zeta potential (ZP) results were shown to be crucial to explaining the obtained microbiological data. During the interpretation of the results, a hypothesis was proposed that the mere presence of the nanoparticle charge is not sufficient for the bacteriophage to adhere in an orderly and specific way to the nanoparticles, consequently affecting the performance of the phage. The zeta potentials of the nanoparticles had the greatest impact on the observed interactions. ZP thresholds were set at: ZP < -35 (mV) for phage tail binding effect and ZP > 35 (mV) for phage head binding effect. When the nanoparticles did not meet these requirements, the physical interactions of the phage-nanoparticle mixes became non-specific. It was also shown that the nanoparticles affected the lytic activity of the phage, regardless of their concentration used. Most of the studied nanoparticles had a positive effect on the lytic efficiency of the phage, with the exception of SiO₂ and Fe₃O₄-SiO₂, with the ZP potential lower than 35 (mV), binding to the phage tail [D-2].

The antibacterial effect of plant extracts is a subject of unflagging interest from the scientific community, often described in the professional literature. However, papers describing the effect of extracts on lytic bacteriophages is a relatively rare topic, and available publications are largely outdated, so they also use very basic and inaccurate methods. Studies presenting the results of combining plant extracts and phages in a bacterial environment are even rarer, which is why it was decided to conduct interaction analyzes of these multifactor mixtures using many modern research methods [D-3, unpublished paper B-1]. Reference lytic bacteriophages (MS2, T4 and phi6) and methanolic plant extracts obtained from echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) were used in this study. Due to the complexity of interactions, the following experiments were carried out: evaluation of the effect of plant extracts on bacterial host cells using the microdilution method, evaluation of the effect of plant extracts on the activity and plaque-forming ability of phages by co-incubation method, synographies of static interactions of plant extracts and phages in the bacterial host environment, phage lysis profiles during dynamic growth experiments of the tested mixtures in bioreactors and visualization of the effect of plant extracts and phages on bacterial host cells using a scanning electron microscope (SEM). The studies showed the presence of antagonistic interactions: extracts of echinacea and rue showed antiphage and bactericidal activity. It was proved that the effect of low extract concentrations on microorganisms depended on the tested phage and bacterial hosts species, while high concentrations generally inhibited bacterial lysis. Moreover, the interactions observed in the static environment differed from those performed in the dynamic environment, which indicated the crucial importance of performing multiple analyzes when studying such complex mixtures [D-3].

28. 06. 2023 r.

Xymena Steduka

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 bipolarny wirion 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 łysinek 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



Gdańsk 17.11.2023

Dr hab. inż. Piotr Szweda
Katedra Technologii Leków i Biochemii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Xymeny Stachurskiej zatytułowanej:
„Wpływ wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność
bakteriolityczną bakteriofagów”**

Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej

Zjawisko lekooporności drobnoustrojów staje się jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. W trakcie ostatnich dwóch-trzech dekad liczba infekcji wywoływanych przez mikroorganizmy (bakterie a także grzyby) o obniżonej wrażliwości na stosowane chemioterapeutyki bardzo szybko rośnie. Szczególnie trudne są terapie zakażeń wywoływanych przez bakterie wielolekooporne zaliczane do tzw. grupy ESKAPE (akronimu wywodzi się od nazw gatunków/rodzajów bakterii zaliczanych do tej grupy: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacter*). Niestety, nie idzie to w parze z identyfikacją i wprowadzaniem do praktyki klinicznej nowych antybiotyków. Stąd konieczne jest poszukiwanie nowych, alternatywnych i przede wszystkim skutecznych metod profilaktyki i zwalczania infekcji wywoływanych przez bakterie i grzyby patogenne. Badania, które w ramach swojej pracy doktorskiej prowadziła Pani mgr inż. Xymena Stachurska wpisują się w ten nurt. Na stronach 14 i 15 Autorka rozprawy przedstawiła cel ogólny i cztery cele szczegółowe swoich badań. Podstawowym obiektem zainteresowań Doktorantki było określenie wpływu wybranych antybiotyków, nanocząstek oraz ekstraktów roślinnych na aktywność przeciwbakteryjną bakteriofagów litycznych. Jest to tematyka bardzo ciekawa i przede wszystkim oryginalna. Bakteriofagi zostały odkryte w 1915 r. przez Williama Tworta, a już w 1917 r. (10 lat przed odkryciem penicyliny) Felix d'Herelle zwrócił uwagę na ich potencjał terapeutyczny – „jako czynniki skutecznie zabijające bakterie”. Paradoksalnie, czynnikiem, który na wiele lat zahamował badania potencjału leczniczego fagów i ich bardziej powszechne stosowanie w praktyce klinicznej, był dostęp do coraz większej ilości antybiotyków. Od mniej więcej dwudziestu – trzydziestu lat obserwuje się ponowny, wyraźny wzrost zainteresowania bakteriofagami, także pod kątem wykorzystania ich jako zamiennika antybiotyków. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały opublikowane w postaci czterech prac (trzy już opublikowane, jedna w trakcie recenzji), które ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych i bez wątpienia stanowią istotny wkład w literaturę światową dotyczącą interakcji bakteriofagów z innymi czynnikami przeciwbakteryjnymi. Ponadto jedna z prac (D-1) zawiera szereg wskazówek dotyczących metodologii badań interakcji fagów litycznych i antybiotyków przeciwbakteryjnych, co dodatkowo podnosi wartość tej publikacji. W mojej ocenie oryginalna tematyka i dobrze przygotowany plan badań są istotnymi atutami recenzowanej pracy doktorskiej.

Ocena formalna pracy doktorskiej

Kandydatka do stopnia naukowego doktora Pani mgr inż. Xymena Stachurska przedłożyła rozprawę doktorską pt. „Wpływ wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriolityczną bakteriofagów”, która została wykonana pod kierunkiem Pana dr. hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Podstawą rozprawy jest cykl 4 jednotematycznych publikacji, w których badano wpływ różnych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriolityczną bakteriofagów. Zasadniczą część opracowania stanowią więc kopie publikacji. Poza tym najważniejszymi częściami pracy są:

1. Opis wkładu Doktorantki w przygotowanie poszczególnych prac oraz zestawienie parametrów bibliometrycznych prac stanowiących podstawę pracy – strony 2 i 3;
2. Przedstawienie osób i jednostek naukowych, z którymi Autorka pracy prowadziła współpracę – strona 4;
3. Spis treści – strona 7;
4. Streszczenie w dwóch wersjach językowych – strony 8-11;
5. Wprowadzenie – strony 12 i 13;
6. Przedstawienie hipotez pracy – strona 14;
7. Przedstawienie celu prowadzonych badań – strony 14 i 15;
8. Opis materiałów i metod badawczych – strony 15 – 23;
9. Omówienie uzyskanych wyników – strony 23 – 29;
10. Wnioski – strony 29 i 30;
11. Spis piśmiennictwa – łącznie 43 pozycje, głównie publikacje naukowe z renomowanych czasopism naukowych, które ukazały się w przeciągu ostatnich 15 lat, strony 30-32
12. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych – strony 32 – 37

W dalszej części pracy, w której nie stosowano numeracji stron, przedstawiono:

1. Załącznik 1 - Kopie trzech publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską;
2. Załącznik 2 - Kopie suplementów do tych publikacji;
3. Załącznik 3 – Oświadczenia współautorów ww. prac;
4. Załącznik 4 – Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego Autorki.

W mojej ocenie taki układ dysertacji jest prawidłowy i nie budzi poważnych zastrzeżeń. Przy czym muszę przyznać, że z punktu widzenia recenzenta zauważyłem kilka niedogodności wynikających z takiej organizacji tekstu opracowania:

1. Uważam, że należało konsekwentnie kontynuować numerację stron w pracy – także w części, w której przedstawiono załączniki. W aktualnej wersji recenzentowi trudno odnosić się do tych fragmentów tekstu, które są zlokalizowane w części dysertacji, w której strony nie są numerowane (podanie strony byłoby w tym miejscu dużym ułatwieniem);
2. Opis wkładu Autorki pracy w prowadzone badania i przygotowanie manuskryptów publikacji należało umieścić po spisie treści;
3. Suplementy do kolejnych publikacji chyba lepiej byłoby prezentować bezpośrednio po każdej z prac;
4. Najważniejsza moja uwaga dotyczy publikacji nr 4, która została zakwalifikowana przez Autorkę jako element cyklu publikacji, ale nie został jeszcze oficjalnie zaakceptowany przez recenzentów (jest w trakcie oceny). Myślę, że mimo to należało

w pracy przedstawić „preprint”, który dostępny jest już pod adresem internetowym, który Pani mgr inż. Xymena Stachurska zaprezentowała na stronie nr 3.

Są to oczywiście drobne uchybienia, które nie mają wpływu na ogólną wartość i ocenę pracy.

Należy przyznać, że pod względem edytorskim i formalnym praca przygotowana jest bardzo starannie. Nie stwierdziłem istotnych błędów w zakresie nazewnictwa fachowego, w tekście rozprawy praktycznie nie występują błędy edytorskie – tzw. literówki. Z obowiązku recenzenta wspomnę tylko o drobnych uchybieniach edytorskich:

1. Strona nr 2 – „mikrobiologiczne reagenty testowe” – trochę niejasne sformułowanie;
2. Strona nr 15 – „Ocena wpływu sześciu wybranych nanocząstek ...” – raczej proponowałbym „sześciu wybranych typów nanocząstek”;
3. Strona nr 19 – „pomiar OD₆₀₀” – typowy żargon laboratoryjny, oczywiście chodzi tu o pomiar gęstości optycznej zawiesiny komórek, który wykonano przy długości fali równej 600 nm.;
4. Strona nr 20 – „wortexując i końcowo wirując” - oczywiście są to skróty myślowe;
5. W opisach uzyskanych wyników doktorantka podaje dwie wersje językowe tematyki badawczej, która była analizowana w kolejnych „Zagadnieniach”. W mojej ocenie podawanie angielskiej wersji językowej jest zbędne;
6. Strona nr 28 - „odbicia wzrostu hodowli” – to sformułowanie też zakwalifikowałbym jako żargon laboratoryjny;
7. Strona nr 36 – Autorka pisze „... zespół badawczy, którego byłam cześcią...” – w mojej ocenie lepiej brzmi sformułowanie – zespół badawczy, którego byłam członkiem.

Są to drobne uchybienia, które nie mają wpływu na ogólną wartość pracy.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Pod względem merytorycznym rozprawę oceniam bardzo wysoko. Na uwagę zasługuje multidyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań oraz fakt wykorzystania szerokiego spektrum technik badawczych. Wyniki uzyskanych badań zostały już opublikowane. Trzy prace ukazały się już w renomowanych czasopismach naukowych, jedna jest aktualnie oceniana przez recenzentów. Zaakceptowane prace, z pewnością zostały już poddane wnikliwej ocenie recenzentów. Pozwolę sobie w związku z tym przedstawić jedynie krótki komentarz odnośnie każdej prac.

[D-1] Stachurska, X., Roszak, M., Jabłońska, J., Mizelińska, M., Nawrotek, P. (2021)
Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306. DOI: 10.3390/antibiotics10111306. IF2021 – 5,222; 70 pkt. MEiN

Jest to praca typowo metodologiczna. Doktorantka badała różne warianty/modyfikacje testów wykorzystywanych do oceny interakcji antybiotyków – fag lityczny. Spośród 43 antybiotyków, zaliczanych do różnych klas pod względem budowy chemicznej i co za tym idzie mechanizmu działania wyraźny efekt synergii zaobserwowano dla ampicyliny i cefotaksymu. Dla tych dwóch antybiotyków Pani mgr inż. Xymena Stachurska przeprowadziła badania mające na celu wybór optymalnego wariantu metody podwójnej warstwy agaru. Test z użyciem ampicyliny wykazał mniejsze zróżnicowanie między wynikami z różnych modyfikacji metody, w przeciwieństwie do testu z użyciem cefotaksymu. W przypadku tego antybiotyku największą łączną liczbę łysinek uzyskano podczas dodawania antybiotyku do agaru dolnego w obecności agaru górnego. Efektem takiego zabiegu był wzrost ogólnej liczby łysinek o 114% w porównaniu z użyciem samego agaru górnego i o

37% w porównaniu z metodą standardową. Z kolei najlepszą wizualizację efektu PAS uzyskano w wariancie metody, w którym użyto krążki antybiotykowe. W tym przypadku nie zgodziłbym się jednak z informacją przedstawioną na stronie 24: „Antybiotyki te spowodowały zwiększoną ilość morfologicznie większych (niż standardowe) łysinek faga T45, w obrębie stref zahamowania wzrostu bakterii wywołanych antybiotykiem – efekt wskazujący na synergę.” W strefie zahamowania wzrostu bakterie nie rosną, nie można tam więc zaobserwować łysinek. Z resztą w dalszej części pracy Autorka wyraźnie stwierdza: „Ponieważ synergia jest obserwowana jako znacznie zwiększone morfologicznie łysinki fagowe w strefach otaczających krążki antybiotykowe, w których występuje subletalne stężenie leku ...”. Efekt ten jest szczególnie dobrze widoczny na zdjęciach, które przedstawiono w suplemencie do publikacji.

(D-2) Stachurska, X., Cendrowski, K., Pachnowska, K., Piegat, A., Mijowska, E., Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179, DOI: 10.3390/ijms23137179. IF2022 – 6,208; 140 pkt. MEiN

W mojej ocenie jest to najciekawsza praca, którą Pani mgr inż. Xymena Stachurska włączyła do cyklu publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej. Celem badań Doktorantki, które prowadzono we współpracy z Katedrą Fizykochemii Nanomateriałów ZUT, było określenie wpływu wybranych typów nanocząstek na aktywność lityczną faga T4. Bez wątpienia dużą zaletą tej pracy jest bardzo dobry plan badań, w którym uwzględniono zarówno analizę właściwości fizykochemicznych jak i biologicznych wybranych typów nanocząstek. Doktorantka zaobserwowała wyraźną korelację pomiędzy wartością potencjału zeta (ZP) a sposobem łączenia się nanocząstek z wirionami badanego faga, co z kolei wpływa na aktywność bakteriolityczną wirusa. Doktorantka wykazała, że: 1. w przypadku materiałów, dla których wartość $ZP < -35$ mV nanocząstki wiążą się elektrostatycznie (odwracalnie) z dodatnio naładowanymi włóknami ogonka faga (co oczywiście skutkuje obniżeniem zdolności litycznych); 2. w przypadku nanomateriałów charakteryzujących się wartością $ZP > 35$ mV następuje ich łączenie się z główkami faga (pod względem aktywności bakteriolitycznym powoduje to wzrost aktywności); 3. nanomateriały, których wartości potencjału zeta zawierają się pomiędzy tymi wartościami oddziałują z fagami w sposób nieuporządkowany. Uważam, że wyniki te mają dużą wartość zarówno poznawczą jak i aplikacyjną. Odnośnie tej części badań mam dwa pytania, i byłbym wdzięczny gdyby Pani mgr inż. Xymena Stachurska mogła się do nich odnieść w trakcie obrony:

1. Czy wartości graniczne potencjałów ZP w odniesieniu do ich sposobu oddziaływania z fagiem T4 są rzeczywiście takie ostre, czy są to wartości „umowne”;
2. Czy na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że sposób oddziaływania dowolnego typu nanocząstek (o ustalonej wartości ZP) z dowolnym fagiem jest przewidywalny?

W obydwu przypadkach chodzi o krótki komentarz/opinię Doktorantki, absolutnie nie oczekuję dogłębnej analizy tych zagadnień.

W przypadku kolejnych dwóch prac Pani mgr inż. Stachurska skupiła się na badaniu interakcji pomiędzy fagami i ekstraktami uzyskanymi z roślin trzech wybranych gatunków (jeżówki purpurowej, ruty i stewii). Na podstawie uzyskanych wyników przygotowano manuskrypty dwóch publikacji:

[D-3] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. (2023) Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a

study on interactions. *Applied Sciences*, 13, 4575, DOI: 10.3390/app13074575. IF2023 – 2,838; 100 pkt. MEiN – praca opublikowana

[B-1] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. The use of plant extracts and bacteriophages as an alternative therapy approach in combating bacterial infections: the study of lytic phages and *Stevia rebaudiana*. DOI: 10.1101/2023.06.27.546765 – praca w trakcie oceny

W wyniku przeprowadzonych badań (bardzo dobrze zaplanowanych) we wszystkich przypadkach Doktorantka zaobserwowała efekt antagonistyczny. Odnoszę wrażenie, że Pani mgr inż. Stachurska jest nieco zawiedziona tym faktem. Moim zdaniem zupełnie niepotrzebnie. Po pierwsze jest to bardzo ciekawa informacja o dużym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym. W przyszłości może być cenną wskazówką przy ustalaniu diety dla osób leczonych za pomocą bakteriofagów. Poza tym w literaturze, wysoką aktywność lityczną fagów zwykle klasyfikuje się jako istotną zaletę. Moim zdaniem nie do końca słusznie. Należy pamiętać, że w warunkach *in vivo* duża liczba komórek bakteryjnych skutkuje bardzo szybkim uwalnianiem do organizmu/krwioobiegu gospodarza (np. człowieka lub zwierzęcia) dużej ilości czynników prozapalnych (np. fragmentów peptydoglikanu) co z kolei może spowodować bardzo intensywną (niepożądaną) reakcję układu immunologicznego. Uważam, że w przyszłości substancje/produkty częściowo hamujące aktywność lityczną bakteriofagów także mogą znaleźć ciekawe zastosowania w praktyce klinicznej. Żałuję, że Doktorantka nie zamieściła w pracy manuskryptu („preprintu”) ostatniej z prac. Analizowałem tą pracę i uważam, że podobnie jak pozostałe prace stanowiące podstawę powyższej dysertacji jest to bardzo dobra publikacja naukowa.

Opis Dorobku Doktorantki

Wyniki, które Doktorantka uzyskała w trakcie realizacji swojej pracy doktorskiej zostały już opublikowane w postaci trzech artykułów, które ukazały się renomowanych czasopismach naukowych o wysokich wartościach IF:

[D-1] Stachurska, X., Roszak, M., Jabłońska, J., Mizielińska, M., Nawrotek, P. (2021) Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306. DOI: 10.3390/antibiotics10111306. IF2021 – 5,222; 70 pkt. MEiN

(D-2) Stachurska, X., Cendrowski, K., Pachnowska, K., Piegat, A., Mijowska, E., Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179, DOI: 10.3390/ijms23137179. IF2022 – 6,208; 140 pkt. MEiN

[D-3] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. (2023) Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a study on interactions. *Applied Sciences*, 13, 4575, DOI: 10.3390/app13074575. IF2023 – 2,838; 100 pkt. MEiN

Kolejna praca jest aktualnie w trakcie oceny:

[B-1] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. The use of plant extracts and bacteriophages as an alternative therapy approach in combating bacterial infections: the study of lytic phages and *Stevia rebaudiana*. DOI: 10.1101/2023.06.27.546765

Zgodnie z informacją przedstawioną na stronie nr 3 sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) tych prac wynosi 14,268, natomiast ogólna liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MEiN z dnia 1 grudnia 2021 r. wynosi 310. Są to parametry

bardzo dobre, osiągnięcie to należy zaklasyfikować jako duży sukces Doktorantki jak i promotora Pana dr hab. inż. Pawła Nawrotka. Z przeprowadzonej przez mnie analizy wynika, że prace te cieszą się dużą popularnością i były już cytowane 12 razy (od opublikowania pierwszej z prac upłynęły tylko dwa lata).

Na stronach 2 i 3 Pani mgr inż. Xymena Stachurska przedstawiła deklaracje (poparte stosownymi oświadczeniami współautorów, Załącznik nr 3, końcowa część rozprawy strony nienumerowane), z których wynika, że miała ona wiodący udział zarówno w zakresie realizacji prac badawczych jak i przygotowaniu manuskryptów publikacji. Przy czym, chciałbym zaznaczyć, że w mojej ocenie udziały procentowe 80 czy 85%, wydają się trochę przeszacowane, oznacza to udział pozostałych współautorów na poziomie maksymalnie 5% (czyli bardzo niewielkim). Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich prac stanowiących podstawę pracy doktorskiej a ponadto w przypadku prac D-1, D-2 i D-3 jest także autorem korespondencyjnym (dość rzadka sytuacja). W przypadku czwartej z prac Doktorantka także jest pierwszym autorem, natomiast kwestia autora korespondencyjnego nie jest dla mnie jednoznaczna. Z przeprowadzonej przez mnie analizy „preprintu” tej publikacji wnioskuję, że także w tym przypadku Pani mgr inż. Xymena Stachurska jest autorem korespondencyjnym, ale formalnie nie jest to potwierdzone w tekście tego opracowania.

Bez wątpienia świadczy to o dużym zaangażowaniu Pani mgr inż. Xymeny Stachurskiej w realizację projektu badawczego dotyczącego jej pracy doktorskiej.

Natomiast analizując dorobek naukowy Doktorantki byłem pozytywnie zaskoczony jej dużym zaangażowaniem w badania nie związane bezpośrednio z przygotowywaną pracą doktorską. Pani mgr inż. Xymena Stachurska jest współautorem 11 publikacji (w dwóch przypadkach pierwszym autorem) i 3 zgłoszeń patentowych, które nie zostały uwzględnione w cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską. Dziewięć z tych prac opublikowano w czasopiśmie z listy JCR. W Załączniku nr 4 (brak numeru strony) Doktorantka przedstawiła podsumowanie całości swojego dorobku, sumaryczny IF wynosi 48,046, liczba punktów wg wykazu MEiN 1170, H-indeks – 6, prace były cytowane 84 razy (na dzień złożenia pracy, do dnia 10.11.2023 liczba cytowań tych prac wzrosła do 118 a wartość indeksu H do 7). Ponadto Pani mgr inż. Stachurska jest współautorką trzech monografii naukowych, chętnie i aktywnie uczestniczyła w różnego rodzaju szkoleniach, warsztatach, praktykach i stażach, co także jest ważnym elementem jej aktywności naukowej. W tekście dysertacji Autorka wymienia 5 doniesień konferencyjnych i udział w kolejnych 13 konferencjach. Prosiłbym o krótkie wyjaśnienie dlaczego rozróżniono te dwie grupy (Doniesienia konferencyjne/Udział w konferencjach). Bez wątpienia jest to imponujący dorobek naukowy, który świadczy o dużym zaangażowaniu Doktorantki w działalność naukową Katedry, w której miała możliwość pracować.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Xymeny Stachurskiej pt.: „Wpływ wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriolityczną bakteriofagów” jest oryginalną, cenną zarówno pod względem naukowym jak i aplikacyjnym, rzetelnie i starannie przygotowaną pracą naukową, która spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim 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 zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z

wniośkiem o dopuszczenie Pani mgr. inż. Xymeny Stachurskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość poznawczą uzyskanych wyników oraz fakt ich opublikowania w postaci trzech artykułów w renomowanych czasopismach naukowych (ponadto jedna praca jest w trakcie oceny) wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

dr hab. inż. Piotr Szweda, prof. PG

Piotr Szweda

UCHWAŁA NR 48
Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 20 grudnia 2023 r.
w sprawie nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo
mgr inż. Xymenie Stachurskiej

Na podstawie art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.) oraz § 1 ust. 1 pkt 2) uchwały nr 130 Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 29 maja 2023 r. w związku z § 96 ust. 8 Statutu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo uchwala co następuje:

§1

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie po zapoznaniu się z przebiegiem przewodu doktorskiego postanawia nadać stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo mgr inż. Xymenie Stachurskiej.

§2

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodnicząca Rady Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo

dr hab. inż. Małgorzata Ożgo, prof. ZUT

Szczecin, dnia 20 grudnia 2023 r.