



Politechnika Łódzka

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

Prof. dr hab. inż. Stanisław Bielecki,

Łódź, 1 czerwca, 2021 r.

R E C E N Z J A

pracy doktorskiej mgr Gracji Topka-Bieleckiej

pt.: „Charakterystyka wybranych bakteriofagów wyizolowanych ze ścieków komunalnych

- badania na poziomie molekularnym i potencjalne znaczenie biotechnologiczne".

wykonanej w Katedrze Biologii Molekularnej

Uniwersytetu Gdańskiego

Pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna i dr hab. Bożeny Nejman-Faleńczyk

Rozprawa doktorska Pani mgr Gracji Topka-Bieleckiej pt: „Charakterystyka wybranych bakteriofagów wyizolowanych ze ścieków komunalnych - badania na poziomie molekularnym i potencjalne znaczenie biotechnologiczne" jest ciekawą, potrzebną i nowatorską w swym ujęciu z zacięciem aplikacyjnym pracą badawczą dotyczącą bakteriofagów. Jako wysoce specyficzne wirusy, w stosunku do swoich bakteryjnych gospodarzy, bakteriofagi są atrakcyjnym środkiem do wykrywania, identyfikacji, określenia patogenności i zwalczania bakterii. Cechy te są szczególnie istotne, gdy odporność patogennych drobnoustrojów na antybiotyki jest coraz większa. Bakteriofagi i opracowana z ich wykorzystaniem fagoterapia, aczkolwiek nie w pełni jeszcze wykorzystywana jest rozważana, jako ostateczna strategia walki z patogenami bakteryjnymi. Inżynieria biologiczna bakteriofagów, znajomość miejsc specyficznego rozpoznawania bakterii a także struktur receptorów bakterii wiążących fagi są podstawą tego działania. Wykorzystanie bakteriofagów do zwalczania patogenów napotyka wiele ograniczeń, takich jak konieczność szybkiej identyfikacji szczepów bakterii, zwiększenie okresu półtrwania faga *in vivo*, skonstruowanie specyficznych biomateriałów jako nośników dostarczających bakteriofagi do określonego miejsca działania. Bardzo często takim miejscem są biofilmy, zawierające zbiorowiska mikroorganizmów wytwarzające macierz z substancji egzopolimerycznych zapewniające im integralność strukturalną i unikalny profil

biochemiczny. Biofilmy są bardzo powszechne w przyrodzie, ale także w obszarach antropogenicznych, gdzie stanowią duże wyzwanie. Biofilmy mogą być korzystne dla zdrowia, na przykład jako normalne składniki mikrobiomu roślin, zwierząt i ludzi, a także mogą stanowić podstawę efektywnych procesów przemysłowych, takich jak np. oczyszczanie ścieków. Często jednak biofilmy w medycynie, są przyczyną przewlekłych infekcji, a w procesach przemysłowych uniemożliwiają przepływ surowców czy produktów, gdyż zanieczyszczają powierzchnie rur i zatykają urządzenia filtracyjne.

W swoich badaniach mgr Gracja Topka-Bielecka zajmuje się niektórymi ze wspomnianych powyżej zagadnień, a w szczególności procesem zwalczania biofilmu bakteryjnego. Wpisuje się w ten sposób we współczesne obszary badawcze pokazując bakteriofagi, jako nowoczesne narzędzia w kontroli efektywnego oddziaływania na patogeny, a także dostarczając nowej wiedzy do dyskusji o społecznej akceptacji fagoterapii. Celem jej badań w ramach pracy doktorskiej było cyt.: ...” wyizolowanie i scharakteryzowanie nieznanych wcześniej fagów litycznych, wykazujących potencjalne zastosowanie w walce z biofilmem bakteryjnym.” Fagi specyficzne wobec *Escherichia coli* - vB_EcoS-95 i *Enterococcus faecalis* – vB_EfaS-271 wyizolowała ze ścieków komunalnych. Na podstawie danych literaturowych, swojego doświadczenia i współpracy w badawczej grupie projektowej scharakteryzowała wyizolowany fag vB_EcoS-95 określając jego cechy morfologiczne, biologiczne i genetyczne pokazując brak przeciwwskazań na użycie go w medycynie, określiła zakres gospodarza, aktywność lityczną i czas latencji udowadniając, że fag ten wytwarza wystarczającą liczbę wirionów niezbędną do skutecznej lizy komórek gospodarza. Ponadto zidentyfikowała gen białka litycznego który intensyfikuje wspomniany proces lizy. Najefektywniejszy proces lizy komórek w biofilmie nastąpił przy stosowaniu preparatu fagowego o wysokim mianie. Doktorantka przypuszcza, że wysoka aktywność tego faga w zwalczaniu biofilmu *E. coli* powiązana z krótkim okresem latencji predestynuje go do wykorzystania nad rozwojem nowatorskich narzędzi biotechnologicznych do inżynierii genetycznej. Kolejny fag pokazujący swój użyteczny potencjał antybakteryjne, nowo odkryty przez doktorantkę to fag vB_EFaS-27. Fag ten infekujący nie tylko kliniczny szczep *Enterococcus faecalis* ale i inne enterokoki. Oprócz określenia podstawowej charakterystyki tego faga i wykazania krótkiego okresu jego latencji zidentyfikowała w jego genomie geny kodujące białko podobne do polimerazy DNA typu B pełniące istotną funkcję w skutecznej replikacji genomu faga. Fag ten wykazywał zdolność do niszczenia biofilmu utworzonego przez szczep *E. faecalis*

Uzyskując wstępnie cel założonych badań swojego doktoratu poprzez odkrycie i zidentyfikowanie fagów oddziałujących na biofilmy drobnoustrojowe doktorantka przeprowadza eksperymenty dotyczące interakcji bakteriofaga vB_EfaS-271 z komórkami *E. faecalis*. W oddziaływaniu tym fag obniża przeżywalność i liczbę komórek bakteryjnych na powierzchni cewnika Foley'a, jednakże powoduje też powstawanie mutantów

fagoopornych. Dalsze badania doktorantki wskazują, że vB_EfaS-271 nie wykazuje efektu cytotoksycznego na komórki eukariotyczne.

Przedstawiając w dużym skrócie istotne osiągnięcia doktorantki chciałbym powiedzieć że tematyka bakteriofagów działających na szczepy *E.coli* czy *E.faecalis* jest przedmiotem zainteresowań wielu laboratoriów. W latach 2019-2021 w których publikował zespół w skład którego wchodzi mgr Gracja Topka-Bielecka pojawia się według PubMed 261 publikacji przy wyszukiwaniu według haseł „bacteriophage” AND „E. coli”, a przy wyszukiwaniu według „bacteriophage” AND „E. faecalis” - 27 publikacji. Natomiast przy użyciu słów „bacteriophage” AND „vb_EcoS-95” mamy w ostatnich 10 latach widoczną tylko 1 publikację a przy słowach „bacteriophage” AND „E. faecalis” mamy 2 publikacji i są one współautorstwa pani mgr G. Topka-Bieleckiej. Podobnie przy słowach bacteriophage and depolymerases and bacterial biofilms mamy dwie publikacje z tym jedna współautorstwa doktorantki. Dane te wskazują na nowatorstwo badań i odkrywczość wyników w wybranym obszarze badawczym przedstawionych w doktoracie pani mgr Gracji Topka-Bieleckiej.

Podobnie jak odpowiednio zaplanowany i przeprowadzony jest nowoczesny ciąg badań, tak również i przedstawiona rozprawa doktorska jest przedstawiona w sposób komunikatywny. Jest ona zbiorem czterech publikacji opublikowanych w latach 2019 -2021 w których doktorantka jest pierwszym współautorem i zawiera informację o źródłach finansowania badań, podziękowania, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, dorobek naukowy doktorantki i oświadczenia współautorów wskazujące na dominującą rolę Doktorantki w badaniach i w publikacjach.

Wyśmienitymi wprowadzeniem w obszar badawczy Doktorantki jest pierwsza publikacja pt. *Bacteriophage-Derived Depolymerases against Bacterial Biofilm* autorstwa Gracji Topka-Bieleckiej, Aleksandry Dydeckiej, Agnieszki Necel, Sylwii Bloch, Bożeny Nejman-Faleńczyk, Grzegorza Węgrzyna i Alicji Węgrzyn, oparta na przeglądzie 145 pozycji literaturowych. Doktorantka opracowała rozdziały dotyczące depolimeraz bakteriofagowych jako alternatywy dla antybiotyków w zwalczaniu biofilmów bakteryjnych i rozdział o terapiach skojarzonych z innymi czynnikami antybakteryjnymi oraz uczestniczyła w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji. Publikacja ta wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące postępu w badaniach nad sposobem powstawania biofilmów, ich charakterystyką i opornością na antybiotyki oraz różnymi sposobami zwalczania filmów bakteryjnych. Informacje zawarte w tej publikacji są dobrym odniesieniem do uzyskanych przez doktorantkę wyników i ich dyskusji.

W kolejnych publikacji „*Characterization of Bacteriophage vB-EcoS-95 isolated from urban sewage and revealing extremely Rapid Development*”, mgr Topka-Bielecka przedstawia izolacje faga infekującego różne szczepy *E.coli* i charakteryzującego się ekstremalnie szybkim rozwojem w komórkach *E.coli*. Określa kinetykę adsorpcji tego faga na komórkach gospodarza i jego wewnętrzny rozwój. Śledzi kinetykę rozwoju procesu litycznego i rozkład biofilmu a także i żywotność komórek *E coli* w biofilmie. Podobnie

charakteryzuje wyizolowanego faga vb_EfaS-271 infekującego różne komórki *Enterococcus faecalis* w publikacji *Characterization of the Bacteriophage vb-EfaS-271 infecting Enterococcus faecalis* poszerzając analizę o spektrometrię masową białek faga, przypisując 15 białkom różne funkcje oraz określając wrażliwość wirionów na czynniki zewnętrzne. Podsumowaniem eksperymentów w doktoracie jest w pewnym sensie publikacja *Phage-bacteria Interaction in Potential Application of the Bacteriophage vb-EfaS-271 against Enterococcus faecalis* w której Doktorantka określając relacje fag - bakteria w potencjalnych zastosowaniach faga vb_EfaS-271 ocenia głównie skuteczność działania preparatu fagowego na biofilmy *E.faecalis* utworzone na cewnikach oraz na te bakterie w hodowli wglębnej, odnotowując powstawanie mutantów fagoopornych.

Recenzując pracę doktorską składającą się z opublikowanych już materiałów w czasopismach o wysokim uznaniu międzynarodowym zdaję sobie sprawę, że co najmniej 8-miu recenzentów oceniało stosowaną metodykę, wyniki przedstawionych badań, ich interpretację i dyskusję i wydało rekomendację do publikowania. O nowości przedstawionych przez mgr Topka-Bielecką, wyników wskazują dane bibliometryczne podane przez mnie wcześniej i dane mówiące że prace te mimo krótkiego istnienia w obiegu światowym mają ponad 25 cytowań (Google scholar). Chciałbym tu jeszcze podkreślić dużą ilość nowoczesnych metodyk stosowanych w badaniach. Nie wiem, ile z tej listy metodologii Doktorantka wykonywała sama. Sądzę, że te które podała oceniając swój udział w publikacjach. Niezależnie od tego na ile w innych metodach była wspierana przez współautorów, z pewnością była zaangażowana we wszystkie doświadczenia i analizy, co jest bardzo imponujące.

Analizując przedstawioną rozprawę doktorską chciałbym wspomnieć o dyskusji wyników. Często jest to część, która jest zaniedbywana w pracach doktorskich lub czyta się ją bardziej jak streszczenie. W tym przypadku dyskusja jest w załączonych publikacjach, ale dobrze by było w przedstawionych streszczeniach porównać wyniki z dostępnymi *state of the art* z danego obszaru badawczego

Zwalczanie biofilmu, zarówno w medycynie jak i przemyśle, jest niezwykle trudna. Jedną z przyczyn jest powstawanie, w trakcie działania na biofilm fagów czy antybiotyków, mutantów które mogą przetrwać terapię i odrastają po odstawieniu czynników bakteriobójczych. Doktorantka zaobserwowała powstanie opornych mutantów *E.faecalis* i sugeruję że taki mutant cyt ...”zwykle nie jest w stanie przeprowadzić jednego z procesów fizjologicznych (przynajmniej do pewnego stopnia), w odróżnieniu od komórki typu dzikiego” i uważa, że jako upośledzony może być wyeliminowany przez inne czynniki bakteriobójcze. Wydaje mi się, że to wyjaśnienie jest raczej spekulacją, ale przy takiej ilości danych dopuszczalną. Inną przyczyną trudności w zwalczaniu biofilmów jest niewystarczająca wiedza o strukturze biofilmu, o jego właściwościach mechanicznych, które są efektem właściwości fizycznych, chemicznych i interakcji składników macierzy biofilmu. Mgr Gracja Topka-Bielecka zauważa w artykule pierwszym, przeglądowym że konieczne

jest badanie mechanizmów synergii pomiędzy depolimerazami fagowymi, a innymi czynnikami eliminującymi biofilmy. Wydaje mi się do Jej sugestii odnośnie przyszłych badań należy dodać konieczność poznania reologii biofilmów poddawanych fagoterapii.

Przechodząc do końcowej części mojej recenzji chciałbym podkreślić, że przedstawione wyniki badań ukazują bardzo ważne cele użytkowe zarówno z medycznego jak i przemysłowego punktu widzenia. Pani mgr Gracja Topka-Bielecka krytycznie podchodzi do otrzymanych wyników, ściśle współpracuje z innymi ośrodkami badawczymi i wykorzystuje nowoczesne metody badawcze. Jestem przekonany, że wprowadzając dalej nową wiedzę z zakresu eliminacji biofilmów zwiększy efektywność proponowanych przez siebie rozwiązań. Jak już wspominałem rozprawa doktorska mgr Gracji Topki-Bieleckiej jest napisana, w sposób jaki życzyli sobie edytorzy czasopism, w których wyniki doktorantki były opublikowane, natomiast streszczenia w języku polskim i angielskim i oświadczenia współautorów są przekazane w sposób komunikatywny.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną, jakość i zakres wykonanych doświadczeń, przedstawioną do recenzji rozprawę oceniam pozytywnie. Uważam, że mgr Gracja Topka-Bielecka przedstawiła rozprawę doktorską, której wyniki znacząco poszerzają wiedzę w zakresie procesów zwalczania biofilmów. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki ujęte w art.13 pkt.1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz. 1789), z późniejszymi zmianami. Spełnia też wymogi zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne, Uniwersytetu Gdańskiego i Wydziału Biologii UG. o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



