

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

KATEDRA MIKROBIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

Centrum Dydaktyczno-Badawcze Nanotechnologii
al. Piastów 45, 70-311 Szczecin

tel. (091) 449 67 10; 67 13; fax (091) 454 16 42

Szczecin, dn. 24 czerwca 2022 r.

Dr hab. inż. Paweł Nawrotek, prof. ZUT

tel.: 91-449-6710

e-mail: pawel.nawrotek@zut.edu.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Necel,

pt.

„Morfologiczna i molekularna charakterystyka bakteriofaga vB_Eco4M-7,
wirulentnego wobec patogennych bakterii *Escherichia coli* O157:H7”

(„The morphological and molecular characterization of bacteriophage vB_Eco4M-7,
virulent to the pathogenic *Escherichia coli* O157:H7”),

wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Grzegorza Węgrzyna i dr Sylwii Bloch (promotor pomocniczej) w Katedrze Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

Nowe i powracające patogeny, a jednocześnie rosnący odsetek szczepów wielolekoopornych, stały się niezmiernie istotnym problemem zdrowia publicznego na świecie. Fakt ten wyznaczył także główny kierunek działań związanych z prewencją i terapią bakteryjnych chorób zakaźnych, skłaniając do poszukiwania bardziej skutecznych oraz bezpiecznych środków wykazujących specyficzną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Z tego właśnie powodu wysiłki wielu zespołów badawczych skupiają się obecnie na prowadzeniu szeroko zakrojonych badań ukierunkowanych na opracowaniu i wdrażaniu alternatywnych metod eradykacji groźnych bakterii.

W tym kontekście odkryte ponad 100 lat temu bakteriofagi (fagi), wirusy specyficzne dla komórek bakteryjnych, znajdują zastosowanie zarówno w jedno- lub wielofagowej terapii chorób bakteryjnych, jak również w ich profilaktyce. Złożoność strukturalna cząsteczek tworzących wirion fagowy oraz unikalna biologia sprawiają, że bakteriofagi jako pasażowalne jednostki bakteriolytyczne

mogą być wykorzystywane nie tylko w lecznictwie, ale również w procesach sanizacji, biokontroli czy też biokonserwacji żywności. Szczególne znaczenie przypisuje się im w zwalczaniu większości patogenów bakteryjnych, które charakteryzują się zdolnością do wytwarzania toksyn i biofilmu, bądź w różny sposób implikują problemy związane z leczeniem. Przykładem takich patogenów są shiga-toksyczne szczepy *Escherichia coli* (shigatogenic *E. coli* – STEC), które wraz z podgrupą enterokrwotocznych szczepów *E. coli* (enterohemorrhagic *E. coli* – EHEC), charakteryzują się m.in. zdolnością do wytwarzania cytotoksyn Shiga (Stx). Zidentyfikowane 40 lat temu, jako groźny czynnik zakażeń pokarmowych u ludzi, szczepy STEC obejmują ponad 400 serotypów, spośród których ok. 100 wyizolowano z przypadków chorobowych u ludzi. Patogeny te są wyjątkowe nie tylko za sprawą złożonego patomechanizmu działania, bardzo niskiej dawki zakaźnej czy dróg transmisji, ale także ze względu na trudności związane z zastosowaniem standardowej antybiotykoterapii w przypadku zespołów chorobowych powstających na ich tle.

Chociaż zainteresowanie bakteriofagoterapią gwałtownie wzrosło w ostatnich latach, zwłaszcza w obliczu przypadków nieskuteczności rutynowo stosowanych procedur leczniczych, to ich wykorzystanie (oczywiście poza niektórymi krajami, takimi jak np. Polska, gdzie fagi terapeutyczne stosowane były już od dawna) nie zostało jeszcze powszechnie przyjęte przez współczesną medycynę. Z tego względu wszelkie prace badawcze opisujące i charakteryzujące bakteriofagi, w tym zwłaszcza nowo odkryte, mogą przyczynić się do promowania rozwoju i wykorzystania ich potencjału aplikacyjnego. Dlatego też temat podjęty przez Panią mgr Agnieszkę Necel jest niezmiernie istotny i jak najbardziej uzasadniony, przede wszystkim z powodu możliwości uzyskania znaczących efektów leczenia i profilaktyki niektórych chorób bakteryjnych, ale również ze względu na walory poznawcze, wiele wnoszące do wiedzy o bakteriofagach.

Kandydatka do stopnia naukowego przedłożyła pracę doktorską, pt. „Morfolologiczna i molekularna charakterystyka bakteriofaga vB_Eco4M-7, wirulentnego wobec patogennych bakterii *Escherichia coli* O157:H7” (ang. „The morphological and molecular characterization of bacteriophage vB_Eco4M-7, virulent to the pathogenic *Escherichia coli* O157:H7”), wykonaną pod kierunkiem Pana prof. dra hab. Grzegorza Węgrzyna i Pani dr Sylwii Bloch (promotor pomocniczej) w Katedrze Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Na przygotowaną rozprawę doktorską składa się spójny tematycznie cykl trzech oryginalnych artykułów anglojęzycznych opublikowanych w czasopismach naukowych z listy JCR, o sumarycznym wskaźniku oddziaływania wynoszącym 13,105 i łącznej punktacji ministerialnej równej 310). Wszystkie prace opublikowano w latach 2020-2022 w recenzowanych czasopismach posiadających wysoki wskaźnik cytowań i punktację Ministerstwa Edukacji i Nauki wynoszących odpowiednio w przypadku Scientific Reports – IF=4,380 (MEiN=140 pkt.), Toxins – IF=4,086 (MEiN=100 pkt.) oraz Antibiotics – IF=4,639

(MEiN=70 pkt.). W publikacjach tych Kandydatka była pierwszym współautorem, a ze złożonych przez Doktorantkę oświadczeń wynika, że Jej wkład w poszczególne publikacje był znaczący i polegał na planowaniu wszystkich przeprowadzonych eksperymentów, wykonaniu części specjalistycznych oznaczeń, w tym takich jak: analiza zakresu gospodarzy dla badanych bakteriofagów, charakterystyka cech morfologicznych fagów wraz z analizą ich rozwoju w komórkach użytego szczepu *E. coli* O157:H7 (ST2-8624), oczyszczanie cząstek fagowych z wykorzystaniem wirowania w gradiencie chlorku cezu, przygotowanie prób do sekwencjonowania i analizy proteomicznej, a także ocena wrażliwości cząstek fagowych na czynniki dezynfekcyjne, analiza efektywności powstawania mutantów fagoopornych, czy analiza wpływu faga vB_Eco4M-7, koktajlu fagowego i terapii kombinowanej na biofilmy tworzone przez wykorzystywany w badaniach szczep *E. coli* O157:H7. Ponadto, Autorka uczestniczyła w badaniach mających na celu ocenę toksyczności preparatu fagowego wobec komórek ssaczych, jego stabilności i działania na komórki gospodarza, brała też udział w interpretacji uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu manuskryptów.

Wartym podkreślenia jest fakt, iż mgr Agnieszka Necel posiada w swoim dorobku naukowym, poza trzema wykorzystanymi w niniejszej pracy doktorskiej, inne bardzo znaczące publikacje naukowe o zasięgu międzynarodowym, a także rozdział w książce i patent, w których podejmowana była podobna problematyka, co niewątpliwie miało wpływ na ostateczny kształt, przedstawionej mi do oceny, dysertacji. Doktorantka brała też udział w kilku projektach badawczych, z których jednym kierowała w ramach badań młodych naukowców Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, natomiast dwa wskazała jako źródła finansowania swojej pracy doktorskiej. Pozyskiwanie funduszy w celu realizacji badań wymagających zastosowania zaawansowanych metod badawczych oraz specjalistycznej aparatury jest koniecznością i wymaga, oprócz odpowiedniej wiedzy i umiejętności, także dużych zdolności organizacyjnych. Z kolei, martwić może brak informacji na temat odbytych staży naukowych, w tym zwłaszcza zagranicznych, co w dzisiejszych czasach wydaje się kluczowe dla zapewnienia prawidłowego i stałego rozwoju naukowego.

Ocena formalna pracy

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Necel została zredagowana w sposób typowy dla opracowań, których podstawę stanowią już opublikowane powiązane tematycznie artykuły naukowe. Poza przedrukiem oryginalnych publikacji wraz z suplementem („Supporting information”), w pracy obejmującej łącznie 127 stron, umieszczone zostały kopie oświadczeń dotyczących wkładu w publikację wszystkich współautorów. Całość poprzedzona została krótkim streszczeniem w języku polskim i angielskim, w którym ogólnie nakreślono i omówiono podjętą problematykę tytułem wpro-

wadzenia, a następnie przedstawiono najważniejsze rezultaty badań zawartych w publikacjach składających się na niniejszą rozprawę. Uwzględniając osobową formę prezentacji, kolejne odnośniki do odpowiednich pozycji piśmiennictwa zestawionego na końcu, czy też odniesienia do własnych artykułów, ta część pracy nie ma raczej charakteru typowego streszczenia. Przyznać jednak należy, że zgodnie z intencją Autorki spełniła ona zakładany cel, czyli ukazanie logicznie powiązanego opisu tematyki i wyników pracy, co wydaje się ważne z punktu widzenia całości ocenianej dysertacji. Pracę uzupełniono informacjami o dorobku naukowym Kandydatki, danych bibliometrycznych artykułów wchodzących w skład rozprawy i źródłach finansowania badań, a także spisem treści oraz podziękowaniami.

Ocena merytoryczna pracy

Przygotowana przez mgr Agnieszkę Necel rozprawa doktorska idealnie wpisuje się w szeroki nurt badań naukowych dotyczących mikrobiologicznej oceny przydatności fagów do zwalczania groźnych infekcji bakteryjnych, z równoczesnym uwzględnieniem ewentualnych czynników, które mogą ograniczać użyteczność takiej metody eradykacji. Z drugiej strony bakteriofagi mogą być także z powodzeniem stosowane w ochronie żywności, głównie ze względu na wszechstronne cechy, takie jak np. stabilność termiczna i chemiczna oraz specyficzne działanie uwzględniające szeroki zakres warunków występujących na liniach produkcyjnych. Właśnie takie aspekty, w ujęciu ogólnym, przyświecały niewątpliwie Doktorantce przy planowaniu i realizacji badań własnych. Autorka umiejętnie połączyła poszczególne etapy badań wyznaczone przez zwięźle postawiony cel główny, którym było scharakteryzowanie nowo odkrytego i specyficznego wobec bakterii STEC bakteriofaga o nazwie vB_Eco4M-7, jako potencjalnego narzędzia w terapii zakażeń bakteryjnych oraz biokontroli żywności. Bakteriofag ten został pozyskany podczas wcześniejszych badań zespołu, do którego Kandydatka dołączyła, kontynuując następnie prace dotyczące jego szczegółowej charakterystyki.

Wszystkie przeprowadzone analizy i uzyskane rezultaty zaprezentowano w trzech kolejno ukazujących się artykułach naukowych, które przechodząc już stosowną, szczegółową ocenę recenzentką, potwierdziły swoją wysoką wartość i rzetelność naukową. Tym niemniej obowiązkiem recenzenta jest omówienie znaczenia tych prac, w kontekście wzbogacenia wiedzy na temat bakteriofagów terapeutycznych, a także podjęcie dyskusji z Autorką w celu doprecyzowania interpretacji konkretnych wyników. Od razu jednak należy zaznaczyć, że założenia pracy zostały w pełni zrealizowane, a otrzymane wyniki uzyskały realną wartość aplikacyjną, do czego niewątpliwie przyczyniła się prawidłowo dobrana metodyka badań.

W artykule nr 1 przedstawiono, bardzo obszernie udokumentowaną, charakterystykę nowego bakteriofaga vB_Eco4M-7 określając pełną sekwencję nukleotydową jego genomu, obecność 96 otwartych ramek odczytu, w tym 35, którym udało się przypisać domniemane funkcje, co pozwoliło m.in. na uznanie go za faga litycznego. Jednocześnie wykazano, że genom faga vB_Eco4M-7 jest wolny od genów kodujących toksyny i inne czynniki wirulencji, które mogą wpływać na komórki eukariotyczne. Ten etap badań pozwolił dowieść przydatności nowo odkrytego faga do celów terapeutycznych lub biokontroli żywności. Autorka, w swoim streszczeniu, wskazuje ponadto na fakt, iż w genomie tego bakteriofaga nie występują także geny kodujące czynniki antibakteryjne. Można się domyślać, że chodzi o geny oporności na antybiotyki, jednak nie ma na ten temat bliższych informacji w tekście artykułu nr 1.

Doktorantka, z użyciem zaawansowanych metod genomicznych i proteomicznych, przedstawiła analizowanego bakteriofaga w porównaniu do innego, blisko z nim spokrewnionego faga vB_ECML-117, który wykazując m.in. różnice w sekwencji genu kodującego białko włókna ogonka może charakteryzować się odmienną specyfiką w stosunku do gospodarza. Zresztą podobną właściwość posiadają również cztery inne, wymieniane w tym artykule, fagi wykazujące wysoki stopień homologii z wirusem vB_Eco4M-7. Fakt ten wydaje się istotny, ponieważ Autorka sugeruje możliwość łącznego użycia fagów w preparacie, który dzięki temu, miałby wykazywać większe spektrum działania wobec patogenów transmitowanych drogą pokarmową. Przy tej okazji warto zapytać – *czym jeszcze kierowała się Autorka przy wyborze właśnie tego faga spośród pięciu blisko spokrewnionych bakteriofagów, biorąc pod uwagę, że fag vB_ECML-117 wchodzi już w skład komercyjnego preparatu wielofagowego EcoShield PXTM, stosowanego przeciwko serotypowi E. coli O157:H7?*

W kolejnych etapach, zrealizowanych i opisanych w tym artykule badań, ustalono przynależność taksonomiczną charakteryzowanego faga. Na podstawie obrazu spod transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz analizy pokrewieństwa filogenetycznego zaklasyfikowano odkrytego faga do powszechnie występującej rodziny *Myoviridae*. Ustalono również, wspólnie z fagiem vB_ECML-117, jego zdolność do zakażenia różnych szczepów bakteryjnych reprezentujących pałeczki *E. coli*, w tym przede wszystkim należących do shigatoksynicznego serotypu *E. coli* O157:H7 lub serogrupy O157. Oba bakteriofagi wykazywały aktywność bakteriolityczną także wobec kilku innych izolatów *E. coli* O157:H7 lub O157, ale nie produkujących toksyn Shiga. Autorka potwierdziła, że w przeciwieństwie do faga vB_ECML-117, który infekował także 5 (a nie jak przedstawiono w streszczeniu 6) szczepów *E. coli* z serogrupy O25, fag vB_Eco4M-7 charakteryzował się większą specyficznością. Oba fagi nie atakowały natomiast pozostałych szczepów STEC, w tym z serogrupy O26, czy też kolejnych izolatów *E. coli* nie-O157 oraz innych gatunków bakterii. W świetle podanych danych zasadnym wydaje się jednak uzupełnienie informacji dotyczących typu toksyny Stx produkowanej

przez szczepy STEC wykazujące wrażliwość na infekcję analizowanymi fagami. Toksyna ta bowiem występuje w dwóch podstawowych odmianach oznaczonych jako Stx1 i Stx2, różniących się składem aminokwasowym, strukturą antygenową oraz aktywnością biologiczną. Shigatoksyczne szczepy *E. coli* mogą wytwarzać tylko jedną odmianę toksyny Stx bądź obie odmiany równocześnie, w zależności od obecności jednego lub dwóch profagów lambdoidalnych kodujących toksynę Shiga, zintegrowanych z genomem gospodarza. Sama toksyna uwalniana jest natomiast podczas indukcji tych profagów. Przyjmuje się, że szczepy *E. coli* O157:H7 kodujące toksynę Stx2 są bardziej toksyczne i częściej, w porównaniu do toksyny Stx1, odpowiedzialne za wywoływanie zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS). W tym kontekście, na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż żaden z testowanych fagów nie przyczynił się do indukcji profaga ST2-8624 (zawierającego gen *gfp* zamiast genów *stx*), obecnego w genomie szczepu *E. coli* O157:H7, który wykorzystywano w badaniach.

Ciekawych informacji porównawczych, przedstawionych w artykule nr 1, dostarczyły badania polegające na określeniu morfologii lysinek obu wirusów bakteryjnych, pozwalające na potwierdzenie cech charakterystycznych dla fagów litycznych. Z kolei, dalsza analiza kinetyki rozwoju litycznego badanych bakteriofagów pozwoliła na potwierdzenie ich dużej efektywności oraz wydajności w skutecznym zabijaniu wrażliwych komórek *E. coli* O157:H7. Dodać należy, że wskazano na większą aktywność bakteriolityczną w przypadku nowo odkrytego faga vB_Eco4M-7, przy czym Autorka dowodzi tego na przykładzie porównania właściwości litycznych obu fagów w płynnej hodowli bakteryjnej gospodarza podczas monitorowania jej gęstości optycznej, a także na podstawie liczby bakterii, które przeżyły zakażenie fagiem wyrażonej w jtk/mL. W przypadku oceny szybkości adsorpcji oraz jednoetapowego wzrostu wydaje się natomiast, że nieco lepiej pod tym względem wypadł fag vB_ECML-117 – *czym Doktorantka tłumaczy te różnice?*

Bardzo ważne, zwłaszcza z aplikacyjnego punktu widzenia, było też wykazanie oporności obu fagów na działanie wybranych środków myjących i odkażających, takich jak: 10% mydło i 10% płyn do mycia naczyń, Line-Antibacterial 70 i Virusolve, natomiast wrażliwości na 63% etanol, 0,5% Virkon i 5% Viruton Pulver. Uzyskane dane są interesujące i dlatego wymagają dokładniejszego omówienia. Warto więc zapytać – *jak można zinterpretować otrzymane wyniki?*

Zakładając wykorzystanie bakteriofagów do ochrony żywności przeciwko patogenom *E. coli* O157:H7, wykazującym zdolność przylegania do różnych powierzchni, kolonizowania i formowania na nich biofilmu, Autorka podjęła udaną próbę sprawdzenia czy (charakteryzowany w pracy doktorskiej) fag vB_Eco4M-7 może być skutecznie zastosowany w biokontroli żywności. W tym celu opracowała system walidacji do selekcji bakteriofagów ukierunkowanych na bakterie STEC kontaminujące żywność, oparty na nowo odkrytym fagu, jego gospodarzu – szczepie *E. coli* O157:H7

(ST2-8624) oraz pokrojonych plastrach ogórka (stanowiącego warzywo modelowe) zaszczepionych szczepem gospodarza i fagiem. Ten etap badań został szeroko omówiony w artykule nr 2.

Można zauważyć, że przygotowując eksperyment, Pani mgr Agnieszka Necel uwzględniła specyfikę i warunki związane z ochroną i bezpieczeństwem żywności, co niewątpliwie dowodzi dużej wiedzy i doświadczenia w tym zakresie. Jest to ważne zwłaszcza w realizacji badań eksperymentalnych, których wyniki mają przekładać się na realne warunki związane z produkcją, transportem czy przechowywaniem żywności, w tym np. warzyw. Dlatego zaprezentowane badania można uznać za niezwykle istotne dla kompleksowej charakterystyki potencjału aplikacyjnego analizowanego faga vB_Eco4M-7. Wykazano, że może on skutecznie ograniczać wzrost i namnażanie bakterii STEC, zarówno w modelowym systemie eksperymentalnym na powierzchni plasterków ogórka, jak i w płynnej hodowli w postaci znaczącego spadku jej gęstości optycznej. Efekt ten odnotowywano już po 6 godzinach inkubacji na powierzchni ogórka przy każdej z zastosowanych wartości wielokrotności zakażenia, tzw. MOI (ang. multiplicity of infection), tj. od 0,0001 do 10, a także po ok. 4 godzinach od momentu dodania lizatu fagowego do hodowli bakteryjnej. W tym przypadku (zgodnie z oczekiwaniem) następowało to jednak najefektywniej przy wyższych wartościach MOI (od 0,1 do 10), chociaż warto odnotować, że podczas 24-godzinnej inkubacji na plasterkach ogórka analizowany bakteriofag wykazywał najwyższą aktywność lityczną wobec szczepu gospodarza przy niższych wartościach MOI (od 0,0001 do 0,01). Dodatkowo, zaobserwowano, że wydłużenie czasu inkubacji do 24 godzin spowodowało (w przypadku obu systemów badawczych) pojawienie się mutantów opornych na tego faga, przy wszystkich zastosowanych wartościach MOI. Co więcej, wydajność procesu tworzenia takich mutantów okazała się bardziej efektywna przy wysokich wartościach MOI. Najwyższa wydajność była widoczna przy $MOI = 10$, podczas gdy najniższa wystąpiła przy $MOI = 0,001$. Autorka podjęła próbę interpretacji uzyskanych wyników zakładając, że mogą one być związane z silną presją selekcyjną uwarunkowaną wysokimi wartościami MOI. Taka argumentacja jest logiczna i zgodna z aktualną wiedzą w tym zakresie, jednak wystąpienie tego zjawiska w środowisku naturalnym związanym z żywnością, z pewnością wymaga kolejnych badań.

W dalszej części pracy, opisanej w artykule nr 2, Doktorantka uwzględniła fakt, iż testowany preparat fagowy powinien być bezpieczny dla zdrowia człowieka. W tym celu, we współpracy z Ośrodkiem Badań nad Zwierzętami Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, zaprojektowano i wdrożono ocenę toksyczności faga vB_Eco4M-7 wobec linii komórek ssaczych Balb/3T3. Przeprowadzone badania pozwoliły wykluczyć toksyczność tego bakteriofaga wobec komórek ssaczych, a tym samym, potwierdziły użyteczność przygotowanego na jego bazie lizatu fagowego w procedurach związanych z ochroną żywności przed patogenami z grupy STEC. Przydatność tego preparatu antybakteryjnego do ochrony żywności wykazano ponadto, poprzez oznaczenie równie efektywnej ak-

tywności bakteriologicznej bakteriofaga vB_Eco4M-7, zarówno w temperaturze 37°C, jak i w niższych temperaturach (12°C i 25°C). Dowodzi to dużego potencjału aplikacyjnego tego faga i jeszcze bardziej uprawdopodabnia możliwość jego zastosowania w warunkach terenowych, czyli w warunkach rzeczywistego przechowywania żywności. Jednakże, na co autokrytycznie wskazuje Autorka, należy zachować ostrożność ze względu na zjawisko pojawiania się bakterii opornych na stosowane bakteriofagi.

Odnotowane spostrzeżenia są niezwykle interesujące, z poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia, ale równocześnie skłaniają do refleksji nad sposobem w jaki należałoby zastosować taki preparat fagowy, uwzględniając dyfuzję faga w środowisku bytowania bakterii kontaminujących żywność różnego pochodzenia. Warto pamiętać, że podczas odnotowanych do tej pory epidemii na tle *E. coli* O157:H7 źródłem zakażenia były przede wszystkim niedopieczone hamburgery wołowe oraz (co wydaje się szczególnie ważne ponieważ dotyczy wybuchu dwóch największych epidemii wywołanych przez bakterie STEC) niepoddane obróbce kielki rzodkiewki – w 1996 r. w Japonii i kozieradki – w 2011 r. w Niemczech, przy czym w tym ostatnim przypadku czynnikiem etiologicznym był nietypowy szczep *E. coli* O104:H4. *Jaki jest pogląd Doktorantki w tej sprawie?*

Ostatnim etapem badań, podjętych przez Panią mgr Agnieszkę Necel w ramach rozprawy doktorskiej i szeroko zaprezentowanych w artykule nr 3, było przetestowanie wpływu bakteriofaga vB_Eco4M-7 stosowanego samodzielnie lub w połączeniu z fagiem vB_ECML-117 (jako koktajl fagowy) oraz z różnymi antybiotykami (ciprofloksacyną i rifampicyną) na biofilm utworzony przez szczep *E. coli* O157:H7 (ST2-8624). Mimo, że terapia skojarzona wykorzystująca potencjał fagów litycznych łączonych z antybiotykami przeciwko biofilmom bakteryjnym jest dobrze znaną już strategią walki z groźnymi patogenami, to jednak wciąż wymaga kompleksowych badań, głównie ze względu na odpowiedni dobór fagów i antybiotyków, a także możliwość pojawienia się mutantów opornych na ich działanie. W przypadku bakterii z grupy STEC, jest to tym bardziej wskazane ponieważ poza zdolnością formowania biofilmu skutecznie chroniącego komórki bakteryjne przed różnymi czynnikami fizycznymi i chemicznymi, w tym związkami przeciwbakteryjnymi, patogeny te charakteryzują się toksycznością bezpośrednio związaną ze zjawiskiem indukcji fagowej. Stąd też przygotowane i wykonane badania w tym zakresie można uznać za bardzo ważny element ocenianej dysertacji, wieńczący pełną charakterystykę bakteriofaga vB_Eco4M-7 wirulentnego wobec zjadliwych bakterii *E. coli* O157:H7.

Na szczególne podkreślenie zasługuje oryginalna i rozbudowana procedura badawcza zastosowana do oceny zdolności badanych czynników przeciwdrobnoustrojowych do eliminacji testowanych bakterii STEC z biofilmu. Pozwoliła ona na wykazanie działania tych czynników aplikowanych pojedynczo, sekwencyjnie lub jednocześnie. Taki układ eksperymentu, podczas którego wykorzy-

stywano optymalne i właściwie dobrane metody badawcze, jest logiczny i w pełni uzasadniony w kontekście szczegółowej analizy właściwości antybiofilmowych ocenianych czynników.

Uzyskane wyniki pozwoliły dowieść, że połączenie terapii fagowej i wybranych antybiotyków jest skuteczne w obniżaniu liczby żywych komórek STEC obecnych w biofilmie, a także w zmniejszaniu jego gęstości i grubości, zwłaszcza gdy najpierw zastosowano bakteriofagi (najlepiej koktajl fagowy), a następnie podawano antybiotyk. Doktorantka wyjaśniając zaistniały synergistyczny efekt działania fagów i antybiotyków, słusznie zauważyła, że może on być związany z początkowym rozluźnieniem struktury biofilmu przez bakteriofagi, dzięki czemu antybiotyki mogą dotrzeć do głębszych warstw biofilmu i zwiększyć skuteczność swego działania. Przy okazji odnotowano, że sekwencyjne aplikowanie badanych czynników przeciwdrobnoustrojowych generowało najmniejszą liczbę mutantów opornych na faga vB_Eco4M-7, jak też na wybrane antybiotyki. Dodać jednak należy, iż wprawdzie w żadnych badanych warunkach nie wykryto mutantów opornych na ciprofloksacynę, to pojawiły się pewne izolaty odporne zarówno na fagi, jak i rifampicynę, zwłaszcza w eksperymentach z sekwencyjnym aplikowaniem koktajlu fagowego i tego antybiotyku. *Z czego mogą wynikać te rozbieżności?*

Bardzo ważnym aspektem badawczym, podjętym jeszcze i opisanym w artykule nr 3, było wykazanie czy analizowane czynniki przeciwdrobnoustrojowe mogą powodować indukcję profaga ST2-8624, obecnego w genomie szczepu *E. coli* O157:H7 (ST2-8624). W toku wykonanych badań potwierdzono, że ciprofloksacyna jest skuteczna w indukcji analizowanego profaga, chociaż w mniejszym zakresie niż mitomycyna C, natomiast rifampicyna nie indukuje fagów konwertujących toksynę Shiga. Co więcej, zakażenie komórek gospodarza fagiem vB_Eco4M-7 lub koktajlem fagowym (pojedynczo lub w połączeniu z rifampicyną) całkowicie hamowało proces spontanicznej indukcji profaga Stx. Na tej podstawie można było wysnuć końcowy wniosek, że takie czynniki mogą nie tylko skutecznie uczestniczyć w degradacji biofilmu formowanego przez szczepy STEC, ale również, że rifampicyna lub pokrewne związki mogą zostać uznane za obiecujące, bezpieczne i skuteczne środki stosowane razem z koktajlem fagowym w terapii zakażeń wywoływanych przez shiga-toksyczne szczepy *E. coli*. W świetle tych danych można pokusić się o pytanie – *jakie są realne możliwości wykorzystania tych odkryć w praktyce klinicznej, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, iż w badaniach stosowano antybiotyki dawkowane w stężeniach nadprogowych (skutecznych w zwalczaniu biofilmów, ale w zasadzie niemożliwych do zastosowania w terapii) i czy w związku z tym zakładano przeprowadzenie testów z użyciem dawek terapeutycznych?*

Oczywiście zadane pytania mają jedynie charakter dyskusyjny, pozwalający na zwiększenie waleń poznawczych i praktycznych niniejszej rozprawy. Ze względu na znaczącą wartość uzyskanych i zaprezentowanych rezultatów badań należy jednak podkreślić, że mają one duże znaczenie,

zarówno dla rozwoju wiedzy na temat bakteriofagów, jak i metod stosowanych w ocenie ich potencjału aplikacyjnego.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Wyniki badań uzyskane przez Kandydatkę do stopnia naukowego w dużym stopniu przyczyniły się do zaktualizowania wiedzy na temat praktycznych aspektów badań ukierunkowanych na całościową charakterystykę nowo wyizolowanych bakteriofagów, w tym takich jak zaprezentowany w pracy doktorskiej fag vB_Eco4M-7. Jednocześnie, biorąc pod uwagę przedstawiony w dysertacji cykl powiązanych tematycznie prac i całość przedstawionego dorobku naukowego można stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa, zawiera wartościową, spójną i oryginalną koncepcję badawczą, natomiast analiza i sposób przedstawienia wyników zrealizowanych badań jednoznacznie dowodzą bardzo dobrych kwalifikacji zawodowych Doktorantki.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska 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). **Biorąc powyższe pod uwagę wnoszę zatem o przyjęcie dysertacji i dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Necel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Szczecin, 24 czerwca 2022 r.



dr hab. inż. Paweł Nawrotek, prof. ZUT

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Centrum Dydaktyczno-Badawcze Nanotechnologii
al. Piastów 45, 70-311 Szczecin