



prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski

30.10.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Pawła Korzeniowskiego
pt. „*Biofilmy w produkcji żywności i rola bakteriofagów w ich eradykacji*”.

Praca doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Waldemara Rymowicza

W dobie rosnącej oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz różnych strategii przetrwania jakie przejawiają bakterie tworzące biofilmy, poszukiwanie alternatywnych metod eradykacji biofilmów jest ważnym i aktualnym nurtem badawczym. Bakterie, mające zdolność wytwarzania biofilmów, pojawiających się także w procesie produkcji żywności, przysparzają nie tylko problemów technologicznych, ale także stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia personelu i konsumentów. W tym kontekście podjętą przez Doktoranta tematykę badawczą uważam za ważną społecznie i mogącą mieć potencjalne zastosowania aplikacyjne w produkcji żywności.

Przedstawiona do recenzji praca ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich. W pracy Autor wyróżnił takie rozdziały jak: *Streszczenie, Abstract, Wstęp, Cele i założenia, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Bibliografię oraz Wykaz skrótów.*

Cele jakie postawił sobie Doktorant są istotne nie tylko z poznawczego punktu widzenia, ale dotyczą także aspektów praktycznych mogących mieć bezpośrednie znaczenie w procesie produkcji żywności tj. jaj i tuszek drobiowych. W ramach pracy doktorskiej mgr inż. Paweł Korzeniowski postanowił sprawdzić skuteczność działania bakteriofagów wobec biofilmów tworzonych przez *Salmonella Enteritidis* oraz *Escherichia coli* na powierzchniach biotycznych i abiotycznych w warunkach *in vitro* oraz skuteczność działania koktajli bakteriofagowych wobec biofilmów testowanych bakterii na powierzchni poideł dla drobiu w modelu eksperymentalnie zakażonych zwierząt. Badania ujęte w pracy dotyczą kontekstu produkcji żywności (jaj, tuszek drobiowych), co ma odniesienie do ważnych zagadnień zdrowia publicznego. O ile zasadniczo tematyka podjęta w niniejszej rozprawie (biofilmy pałeczek *Salmonella*, *E. coli*, fagoterapia) jest podejmowana także przez innych autorów, to kontekst badania dotyczący skuteczności wobec testowanych



bakterii, bakteriofagów, scharakteryzowanych uprzednio przez Zespół badaczy z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, jest ważnym elementem nowości w tej pracy i kontynuacją prowadzonych badań. Główne cele pracy dotyczyły działania bakteriofagów wobec biofilmów bakterii tworzonych na powierzchniach biotycznych i abiotycznych, w tym na powierzchni poidel dla drobiu. Cele postawione w pracy doktorskiej zostały przez Doktoranta zrealizowane.

Wstęp jest wprowadzeniem do eksperymentalnej części pracy. Doktorant omawia w nim zakażenia człowieka oraz drobiu pałeczkami *Salmonella* Enteritidis, charakteryzuje pozajelitowe, patogenne *Escherichia coli*. Doktorant omawia także aktualne problemy lekooporności bakterii izolowanych od drobiu, w tym lekooporności pałeczek *Salmonella* oraz *E. coli*. W części teoretycznej Doktorant dokonuje charakterystyki bakteriofagów, także w ujęciu badań historycznych oraz ich budowy czy cykli replikacyjnych. Doktorant omawia również zagadnienia biofilmu bakteryjnego, uwzględniając biofilm pałeczek *S. Enteritidis* i *E. coli* patogennych dla drobiu. Ostatni rozdział *Wstępu* traktuje o zdolności bakteriofagów do eradykacji biofilmu.

Pytania i uwagi do teoretycznej części pracy:

- Proszę o doprecyzowanie jakie jednostki chorobowe u ludzi może powodować zakażenie *S. Enteritidis*? Autor nie wspomina w opisie o salmonelozie.
- Jakie struktury komórkowe u *Salmonella* ma Doktorant na myśli, pisząc na stronie 14: „Pałeczki (...) posiadają na swojej powierzchni antygeny złożone z 3-4 monomerów cukrowych mannozy, ramnozy i galaktozy połączonych z lipidami błonowymi”? Opis wydaje się sugerować, iż dotyczy błony zewnętrznej, ale Autor w tekście wspomina o błonie komórkowej. Proszę o doprecyzowanie.
- W rozdziale przedstawiającym cykle replikacyjne bakteriofagów, Autor pisze, iż bakteriofagi wiążą się z różnymi strukturami obecnymi na powierzchni komórek i wymienia wici u bakterii. Myślę, że jest to oczywiste niedopatrzenie, gdyż bakterie wytwarzają rzęski, a nie wici.
- Prawidłowa nazwa gatunkowa to *Enterobacter cloacae*.

Rozdział *Materiały i metody* zasadniczo, od strony formalnej, jest dobrze przygotowany. Doktorant przedstawił listę wykorzystanej w badaniach aparatury, podłoży mikrobiologicznych, informacje o wykorzystanych w badaniach szczepach bakterii oraz bakteriofagach. W metodycznej części pracy Doktorant przedstawił opis namnażania bakterii, namnażania bakteriofagów, metodę ustalania miana bakteriofagów, oznaczania ich liczby z wykorzystaniem metody płytek dwuwarstwowych. Przeprowadzone zostały



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

także testy stabilności bakteriofagów w środowisku o różnych wartościach pH. Interesujący był eksperyment dotyczący badania stabilności bakteriofagów w warunkach imitujących sok żołądkowy, czy wpływ konkretnej paszy dla drobiu na aktywność bakteriofagów. Tworzenie biofilmu bakteryjnego, a następnie jego ograniczanie poprzez działanie bakteriofagów, na powierzchni płytek polistyrenowych badano z wykorzystaniem fioletu krystalicznego. Doktorant badał tworzenie biofilmu bakteryjnego na powierzchni stali nierdzewnej oraz na powierzchni liści sałaty, a także jego eliminację przez zastosowane bakteriofagi. Ciekawy eksperyment dotyczył badań nad eliminacją biofilmu *S. Enteritidis* na powierzchni poidel dla drobiu w warunkach *in vitro*. Zasadnicze elementy opisu metodyki przedstawione dla bakterii z rodzaju *Salmonella* zastosowano także dla *E. coli*. W tej części pracy do badań włączono testy nad biofilmem tworzonym na powierzchni mięsa drobiowego i jego eradykację przez bakteriofagi. Doktorant wykonał także analizę statystyczną do przeprowadzonych badań. Należy podkreślić, iż wykonując zaplanowane eksperymenty Doktorant wykazał się dobrą znajomością technik z zakresu mikrobiologii oraz obszaru nauk weterynaryjnych, a wykonana praca laboratoryjna, biorąc pod uwagę konieczną liczbę powtórzeń, była czasochłonna i wymagała dobrego przygotowania bakteriologicznego.

Pytania i uwagi do *Materiałów i Metod*:

- W jakich warunkach były sterylizowane podłoża mikrobiologiczne? Tej informacji nie odnajduję w tekście rozdziału.
- Szkoda, że Doktorant nie przygotował dokumentacji fotograficznej dotyczącej niektórych fragmentów metodyki, np. badań z zastosowaniem poidel dla drobiu, gdyż z mikrobiologicznego punktu widzenia ich kształt, a także materiał z jakiego są wykonane, mogą mieć znaczenie dla interpretacji wyników bakteriologicznych dotyczących tworzenia biofilmów.
- Czy Doktorant mógłby przedstawić dokładniejszą charakterystykę wykorzystanych w badaniach bakterii (źródło pozyskania, ewentualna oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe)?
- W niektórych podrozdziałach metodyki jaką wykonywał Doktorant brakuje odniesień literaturowych, czy są to autorskie metody Doktoranta?
- Proszę o uzasadnienie wykorzystywania do badań nad biofilmami bakteryjnymi jednej kolonii bakterii jako *inoculum*.

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są ciekawe i dają podstawy do prac nad praktycznymi zastosowaniami i wdrożeniami. Z tego punktu widzenia oceniam je jako



wartościowe, wnoszące nowe dane do nauki i dające podstawę do kontynuacji badań w tym zakresie. Wyniki zostały przedstawione czytelnie (tabele, wykresy), prezentują kolejne etapy badań w pracy doktorskiej. Chciałabym podkreślić bardzo obiecujące wyniki otrzymane dla badań nad redukcją liczby pałeczek *S. Enteritidis* na powierzchni poidła dla drobiu.

Wnioski z pracy Doktorant przedstawił w 6 punktach. Interesujące wyniki z punktu widzenia praktycznych zastosowań dotyczyły zdolności bakteriofagów UPWr_S1-5, UPWr_S123, oraz UPWr_E1-4 i UPWr_E124 do eradykacji biofilmów bakteryjnych tworzonych na powierzchniach biotycznych i abiotycznych. Ważnym wnioskiem, jest ten wskazujący, iż koktajl bakteriofagów UPWr_S134 eliminuje pałeczki *Salmonella* Enteritidis z wielogatunkowego biofilmu znajdującego się na powierzchni poidła. Aplikacyjne zastosowanie dotyczy także wniosku ostatniego, w którym Autor zaznacza, iż bakteriofagi UPWr_E1-4 ograniczają wzrost patogennych dla drobiu *E. coli* na powierzchni mięsa w warunkach chłodniczych.

Pytania i uwagi do rozdziału *Wyniki*:

- Czy znany jest Doktorantowi dokładny skład zastosowanej do badań wysokobiałkowej paszy i czy ten skład mógł mieć wpływ na otrzymane wyniki dotyczące miana bakteriofagów? Czy zastosowaną paszę w badaniu można uznać jako „typowo stosowaną” w hodowli drobiu?
- Wykres 19 zatytułowany jest: „Ogólna liczba drobnoustrojów powierzchni poidła dla drobiu”, a z legendy można się domyślać że chodzi o liczbę *S. Enteritidis*?
- Czy Doktorant może porównać działanie bakteriofagów wobec biofilmów tworzonych na powierzchni stali przez pałeczki *S. Enteritidis* 327 lux oraz *E. coli* 158B lux?
- W eksperymencie dotyczącym eradykacji biofilmu tworzonych przez *E. coli* na powierzchni mięsa drobiowego, Autor zastosował kontrolę negatywną, a wzmianki o tej kontroli nie odnajduję w wynikach.
- Mało czytelny jest wniosek drugi w pracy, który odnosi się w początkowej treści do pałeczek *Salmonella*, natomiast w dalszej części tekstu wniosku pojawia się odniesienie do APEC, co wskazuje na *E. coli*?

Dyskusja jest ciekawa i zasadniczo dobrze poprowadzona, choć zabrakło mi w niej głębszej refleksji Doktoranta nad otrzymanymi wynikami. Część wyników została przedstawiona w dyskusji i zestawiona z wynikami innych autorów, brakuje jednak w tych rozważaniach pogłębionej interpretacji własnych, ciekawych wyników. Interesujące są badania dotyczące suplementacji drobiu bakteriofagami w warunkach hodowlanych. W



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

przyszłości takie badania należałoby połączyć z badaniami immunologicznymi drobiu po podaniu bakteriofagów, ze względu na potencjalny, modulacyjny wpływ fagów na układ odpornościowy. Na takie aspekty Doktorant mógł zwrócić uwagę w dyskusji.

Doktorant w dysertacji posługuje się nomenklaturą specjalistyczną, mikrobiologiczną, niemniej pojawiają się w pracy niezręczne stwierdzenia, błędy literowe czy stylistyczne. Pewnie zastrzeżenia budzą stwierdzenia: „największym rezerwuarem pałeczek *Salmonella* Enteritidis na świecie jest hodowla drobiu”; „degradacja mechanizmów obronnych”, „biofilm zawierający APEC”, „biofilm zawierający pałeczki *Salmonella* Enteritidis” – tutaj raczej powinno być stwierdzenie, iż „biofilm tworzony jest przez pałeczki”, „(...) szczep *E. coli* O157:H7 obecny na powierzchni fileta kurcząt został zredukowany o 97% przy pomocy komercyjnego koktajlu bakteriofagów”.

Podsumowując całość recenzji stwierdzam, iż mgr inż. Paweł Korzeniowski wykonując pracę doktorską, wykazał się umiejętnościami z zakresu mikrobiologii, a wykonując odpowiednie eksperymenty, wyciągnął na ich podstawie prawidłowe wnioski. Praca jest ciekawa, wnosi nowe informacje i obserwacje do dyscypliny nauki biologiczne. Wskazuje na możliwe praktyczne zastosowania bakteriofagów w produkcji żywności i niewątpliwie ma istotne aspekty aplikacyjne i praktyczne. Docenić należy wybór tematyki badawczej oraz zakres zaproponowanych w pracy doktorskiej badań. Pragnę zaznaczyć, iż celem moich uwag i pytań jest podjęcie szerszej dyskusji z Doktorantem.

W konkluzji końcowej stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska pt. „*Biofilmy w produkcji żywności i rola bakteriofagów w ich eradykacji*” mgr inż. Pawła Korzeniowskiego spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023, poz.1668 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Pawła Korzeniowskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Zakład Mikrobiologii
KIEROWNIK
prof. dr hab. Gabriela Bugła-Płoskowska
prof. dr hab. Gabriela Bugła-Płoskowska