

Załącznik nr 3 do wniosku
o przeprowadzenie postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego

Autoreferat

Dr inż. Aneta Skaradzińska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Spis treści

1. Dane osobowe.....	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	3
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	29
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	36
7. Inne informacje, ważne z jego punktu widzenia habilitanta, dotyczące jego kariery zawodowej.....	37

1. Dane osobowe:

Imię i nazwisko: Aneta Skaradzińska

Nazwisko panieńskie: Kurzępa

Miejsce zatrudnienia: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2006 – 2011

tytuł doktora nauk biologicznych uzyskany 11.03.2011

Polska Akademia Nauk, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Laboratorium Bakteriofagowe

Tytuł rozprawy: Wpływ preparatów bakteriofagowych na aktywność migracyjną i właściwości bakteriobójcze ludzkich fagocytów in vitro

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Andrzej Górski

2001 – 2006

tytuł magistra inżyniera uzyskany 14.07.2011

Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny,
Kierunek Biotechnologia

Tytuł rozprawy: Badanie przeciwnowotworowej aktywności nowych preparatów bakteriofagowych

Promotor: Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01.02.2016 – obecnie	Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności <i>stanowisko: adiunkt</i>
01.02.2011–31.01.2016	Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności <i>stanowisko: asystent</i>

Przerwy w karierze naukowej

- **26.03.2016-03.07.2016 i 30.01.2017-24.06.2017 (22 tygodnie)** – urlop macierzyński
 - **18.02.2019-14.07.2017 (17 tygodni)** – urlop macierzyński i zwolnienie lekarskie
 - **01.02.2021-17.09.2021 (33 tygodni)** – zwolnienie lekarskie
 - **20.09.2021-07.02.2022 (20 tygodni)** – urlop macierzyński
- 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).**

TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Doskonalenie kluczowych etapów otrzymywania preparatów bakteriofagowych

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

L.p.	Publikacja	IF ^a	MNI ^b
P1	Skaradzińska A.* , Śliwka P., Kuźmińska-Bajor M., Skaradziński G., Rząsa A., Friese A., Roschanski N., Murugaiyan J., Roesler U. (2017) The efficacy of isolated bacteriophages from pig farms against ESBL/AmpC-producing <i>Escherichia coli</i> from pig and turkey farms. <i>Front Microbiol.</i> 8:530. doi:10.3389/fmicb.2017.00530	4,019	35
P2	Śliwka P., Weber-Dąbrowska B., Żaczek M., Kuźmińska-Bajor M., Dusza I., Skaradzińska A.* (2023) Characterization and comparative genomic analysis of three virulent <i>E. coli</i> bacteriophages with the potential to reduce antibiotic-resistant bacteria in the environment. <i>Int J Mol Sci.</i> 24:5696. doi:10.3390/ijms24065696	6,208	140
P3	Skaradzińska A.* , Ochocka M., Śliwka P., Kuźmińska-Bajor M., Skaradziński G., Friese A., Roschanski N., Murugaiyan M., Roesler U. (2020) Bacteriophage amplification – a comparison of selected methods. <i>J Virol Methods.</i> 282:113856. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113856	2,014	70
P4	Skaradzińska A.* , Skaradziński G., Choińska-Pulit A., Śliwka P., Łaba W., Mituła P., Żaczek M., Weber-Dąbrowska B. (2018) Potential application of lyophilization in commercial use of bacteriophage preparations in veterinary medicine. <i>Slov Vet Res.</i> 55:73-80. doi:10.26873/SVR-396-2017	0,17	20
P5	Choińska-Pulit A., Mituła P., Śliwka P., Łaba W. Skaradzińska A. (2015) Bacteriophage encapsulation: trends and potential applications. <i>Trends Food Sci Technol.</i> 5:327-349. doi:10.1016/j.tifs.2015.07.001	5,15	50
P6	Śliwka P., Mituła P., Mituła A., Skaradziński G., Choińska-Pulit A., Niezgoda N., Weber-Dąbrowska B.,	3,714	40

Żaczek M., **Skaradzińska A.** (2019) Encapsulation of bacteriophage T4 in mannitol-alginate dry microspheres and survival in simulated gastrointestinal conditions. *LWT Food Sci Technol.* 99:238-243.
doi:10.1016/j.lwt.2018.09.043

Sumaryczny IF_{JCR} = 21,275

Sumaryczna ilość punktów MNiSW = 355

^aImpact Factor podany jest dla roku opublikowania artykułu

^bpunktacja MNiSW podana jest dla roku opublikowania artykułu

*autor korespondencyjny

WPROWADZENIE

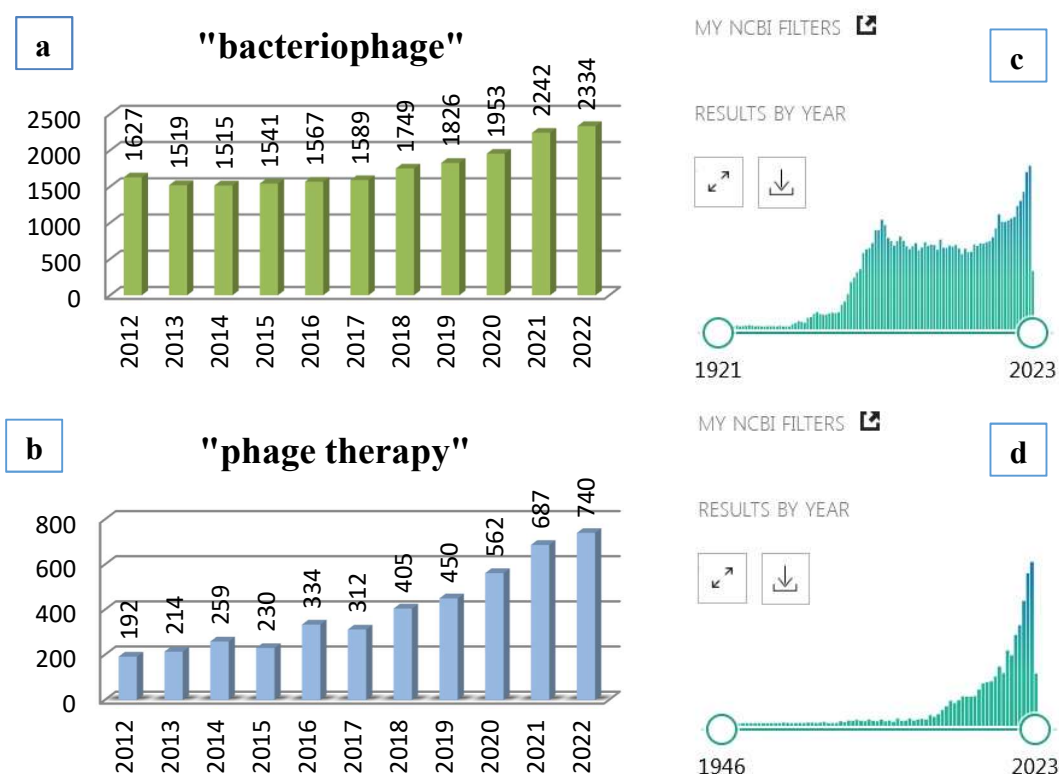
Zjawisko szerzącej się antybiotykooporności bakterii jest jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Co więcej, naukowcy ostrzegają, że liczba antybiotyko-, lub szerzej, lekoopornych szczepów może lawinowo wzrosnąć, co jest efektem pandemii SARS-CoV-2, kiedy to powszechne stało się używanie i nadużywanie środków przeciwdrobnoustrojowych, nie tylko w jednostkach medycznych ale również w innych podmiotach przestrzeni publicznej a także gospodarstwach domowych. Ponadto leki przeciwbakteryjne stanowiły często element terapii COVID-19, nawet w przypadku braku potwierdzenia infekcji bakteryjnej (Mahoney i wsp., 2021). W przeciwieństwie do pandemii SARS-CoV-2, szeroko komentowanej w niemalże wszystkich mediach, antybiotykooporność drobnoustrojów jest nazywana „cichą pandemią”, której niewiele osób jest świadomych (Mendelson i wsp., 2022). Przeciwdziałanie tej „cichej pandemii” jest obecnie jednym z priorytetów współczesnej nauki.

Bakteriofagi są to wirusy infekujące bakterie (phagein – *grec.* jeść, pochłaniać (Sulakvelidze i wsp., 2001)). Stanowią one najliczniejsze byty biologiczne na Ziemi z szacowaną liczbą 10^{31} wirionów (Esteves i Scharf, 2022). Za niezależnych odkrywców fagów uznaje się dwóch mikrobiologów, brytyjskiego badacza Fredericka Tworta oraz francusko-kanadyjskiego uczonego Felixa d’Herelle. To właśnie d’Herelle dostrzegł potencjał tych wirusów w zwalczaniu infekcji bakteryjnych i zapoczątkował formę leczenia, która do dziś nazywana jest terapią fagową (d’Herelle, 1917). Pomimo

początkowych sukcesów, terapia fagowa szybko spotkała się z dużą krytyką ze strony środowiska naukowego. Zwrócono uwagę na szereg ograniczeń tej formy terapeutycznej, które co jednak warto podkreślić, w dużym stopniu wynikały z ówczesnej niedostatecznej wiedzy dotyczącej biologii bakteriofagów (Cisek i wsp., 2017).

Odkrycie w 1928 r. penicyliny i dynamiczny rozwój antybiotykoterapii spowodowały znaczący spadek zainteresowania terapią fagową. Antybiotykoterapia zrewolucjonizowała i zdominowała medycynę praktycznie aż do czasów współczesnych. Terapia fagowa była kontynuowana głównie w ośrodkach mieszczących się na terenach Polski oraz krajów byłego Związku Radzieckiego i to właśnie doniesienia literaturowe pochodzące z tych jednostek są obecnie źródłem najszerszej wiedzy dotyczącej metod leczenia z wykorzystaniem wirusów bakteryjnych (m.in. Babalova i wsp., 1968; Mulczyk i Śłopek, 1974; Kostrzewski i wsp., 1974). Początek renesansu badań nad bakteriofagami przypada na lata 80 XX w. To wówczas opublikowane zostały trzy prace Smitha i Hugginsa (Smith i Huggins, 1982, 1983, Smith i wsp., 1987), w których badacze wykazali efektywność i bezpieczeństwo terapii fagowej, mierząc się jednocześnie z wieloma początkowymi zarzutami względem tej formy leczenia infekcji bakteryjnych. Prace prowadzone na modelach zwierzęcych wykazały m.in., że badania *in vivo* mogą korelować z wynikami obserwowanymi w doświadczeniach *in vitro*. Co więcej wykazano, że pojedyncza dawka preparatu zawierającego fagi może być tak samo skuteczna w zwalczaniu infekcji wywoływanej przez *Escherichia coli* jak ośmiokrotna dawka antybiotyku (streptomycyny). Fagi po podaniu domięśniowym utrzymują wysokie stężenie miejscowo w tkance, jak również w śledzionie przez okres 28 dni, natomiast stosunkowo szybko są usuwane z wątroby oraz krwiobiegu. Badacze skonfrontowali się również z problemem fagooporności, który od samego początku definiowany był jako duże ograniczenie tej formy terapii. Wykazali oni, że bakteria oporna na jednego faga pozostaje wrażliwa na inne wirusy bakteryjne a efektywność terapii fagowej można zwiększyć przez stosowanie mieszanin kilku fagów (koktajli fagowych). W kolejnych latach pojawiły się prace weryfikujące oraz poszerzające obserwacje Smitha i Hugginsa. Badania Soothil (1992) na modelu mysim wykazały skuteczność fagów w zwalczaniu *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*. Z kolei Merrill i wsp. (1996) dowiedli, że możliwe jest uzyskanie faga zdolnego do przedłużonego utrzymywania się w krwiobiegu (Kortright i wsp., 2019).

Narastający w ostatnim czasie kryzys antybiotykoodporności wymusza poszukiwanie nowych metod zwalczania infekcji bakteryjnych mogących stanowić alternatywę do konwencjonalnych strategii terapeutycznych opartych o zastosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania. Niewątpliwie jedną z najbardziej obiecujących alternatyw jest terapia fagowa. Tak jak wspomniano wcześniej, potencjał bakteriofagów w zwalczaniu infekcji bakteryjnych został dostrzeżony już ponad 100 lat temu, natomiast, w ostatnich latach obserwowany jest znaczący wzrost zainteresowania tymi wirusami. Znajduje to pośrednio odzwierciedlenie w ilości artykułów udostępnianych w bazie PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) w latach 2012-2022. Dynamika wzrostu ilości doniesień w tym okresie wyszukiwanych z wykorzystaniem słów kluczowych „bacteriophage” i „phage therapy” została przedstawiona na wykresach poniżej (**Rys. 1**). Choć niewątpliwie na ilość publikowanych artykułów ma wpływ szereg czynników, analizując całą dostępną historię udostępnianych prac również obserwowany jest znaczący wzrost zainteresowania tym obszarem badawczym.



Rys. 1 Liczba artykułów opublikowanych w latach 2012-2022 zamieszczonych w bazie PubMed wyszukiwanych z wykorzystaniem słów kluczowych a)

„bacteriophage” b) „phage therapy”. Rysunki po prawej stronie prezentują całą dostępną historię liczby wyszukiwań dla tych słów kluczowych (c – „bacteriophage”, d – „phage therapy”) (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> 05.05.2023)

Bakteriofagi posiadają kilka unikalnych cech, które czynią je atrakcyjnymi narzędziami w terapiach przeciwbakteryjnych w porównaniu do konwencjonalnych leków. Fagi są wirusami o wysokiej specyficzności, rozpoznającymi i infekującymi często wyłącznie określony szczep gospodarza i tym samym nie mającymi wpływu na naturalną mikroflorę bakteryjną organizmu. Podkreślić jednak należy, że oddziaływanie fagów ze składnikami mikrobiomu człowieka nie są w pełni poznane. Co więcej, w ostatnich latach pojawiło się szereg prac wskazujących, że wpływ fagów na mikrobiom ludzki i zwierzęcy może być znacznie bardziej złożony niż wcześniej przypuszczano (Divya Ganeshan i Hosseinidoust, 2019; Zuppi i wsp., 2022). Niemniej jednak uznaje się, że preparaty fagowe są lepiej tolerowane przez organizm i są uznawane za bezpieczniejszą opcję terapeutyczną niż antybiotyki (Domingo-Calap i Delgado-Martínez, 2018). Często pojedyncza dawka preparatu fagowego wystarczy do uzyskania efektu leczniczego, co wynika z wyjątkowej zdolności fagów do specyficznego namnażania się w miejscu infekcji (Loc-Carrillo i Abedon, 2011; Ryan i wsp., 2011). Bakteriofagi w sposób naturalny zasiedlają układ pokarmowy i oddechowy ludzi. Uznaje się, że pierwsze fagi dostają się do jelita już w przeciągu czterech dni od narodzin (Domingo-Calap i Delgado-Martínez, 2018). Ten naturalny kontakt pośrednio wskazuje również na bezpieczeństwo terapii fagowej i celowego stosowania produktów zawierających te wirusy. Nie bez znaczenia jest fakt, że w porównaniu z antybiotykami pozyskiwanie fagów jest łatwiejsze, szybsze i tańsze (Wang i Zhao, 2022).

Należy podkreślić, że mimo licznych zalet stosowania fagów oraz odrzucenia większości początkowych zarzutów wobec terapii fagowej, wielu badaczy w dalszym ciągu zwraca uwagę na szereg ograniczeń tej formy terapeutycznej takich jak konieczność dobrania faga, lizogenność wirusów bakteryjnych, możliwość wystąpienia niekorzystnych interakcji z układem immunologicznym czy niepotwierdzona skuteczność w badaniach klinicznych. Bez wątplenia jednak, potencjalne wykorzystanie bakteriofagów w zapobieganiu i zwalczaniu infekcji bakteryjnych należy uznać obecnie za istotny naukowy obszar badawczy.

Aktywność fagów wobec szczepów wielolekoopornych (*MDR- multidrug resistant; XDR – extensively drug resistant and PDR – pandrug resistant*) stanowiła wielokrotnie przedmiot doniesień naukowych (Moghadam i wsp., 2020; Torabi i wsp., 2021; Mencke i wsp., 2022). Bakteriofagi mają potencjał w eliminowaniu bakteryjnych patogenów ludzkich, zwierzęcych i roślinnych dzięki czemu mogą być stosowane w wielu obszarach takich jak medycyna, weterynaria, rolnictwo oraz bezpieczeństwo żywności (Garvey, 2022; Sohail i wsp., 2020).

CEL BADAŃ

Naturalną konsekwencją wzrostu zainteresowania bakteriofagami jest konieczność podjęcia wszechstronnych badań mających na celu pogłębienie wiedzy dotyczącej biologii tych wirusów oraz ich interakcji z komórkami niebakteryjnymi. Równocześnie jednak, ważnym aspektem popularyzacji i komercjalizacji fagów jest konieczność opracowywania i standaryzacji metod badawczych stosowanych w pracy z tymi wirusami, zarówno na poziomie laboratoryjnym jak i przemysłowym. Mimo, iż techniki pracy z fagami znane i opisywane są od dawna, rzadko badacze skupiają się na technologicznym aspekcie przygotowywania preparatów fagowych. Stosowane protokoły często są modyfikowane przez naukowców, a co za tym idzie różnią się pomiędzy zespołami badawczymi. Optymalizacja metod pracy z bakteriofagami z jednej strony wydaje się niezbędna w kontekście upowszechnienia zastosowania fagów, z drugiej strony umożliwi lepsze wykorzystanie potencjału tych wirusów, także na poziomie eksperymentalnym. W ramach niniejszego cyklu publikacji skupiono się na trzech zagadnieniach związanych z pracą z bakteriofagami:

- 1) Izolacją ze środowiska nowych fagów o potencjale aplikacyjnym
- 2) Namnażaniem bakteriofagów
- 3) Stabilizacją preparatów fagowych

OMÓWIENIE WYNIKÓW

1. Komentarz do publikacji: Izolacja bakteriofagów [P1-P2]

[P1] Skaradzińska A. i wsp. (2017) The efficacy of isolated bacteriophages from pig farms against ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig and turkey farms. *Front Microbiol.* 8:530. doi:10.3389/fmicb.2017.00530 (IF_{JCR} = 4,019; MNiSW = 35 p)

[P2] Śliwka P. i wsp. (2023) Characterization and comparative genomic analysis of three virulent *E. coli* bacteriophages with the potential to reduce antibiotic-resistant bacteria in the environment. *Int J Mol Sci.* 24:5696. doi:10.3390/ijms24065696 (IF_{JCR} = 6,208; MNiSW = 140 p)

Łatwość pozyskania bakteriofagów ze środowiska naturalnego jest wymieniana wśród najważniejszych zalet tych wirusów, szczególnie w kontekście przygotowywania nowego preparatu o potencjale przeciwbakteryjnym (Loc-Carrillo i Abedon, 2011). Wśród danych literaturowych można znaleźć wiele prac potwierdzających możliwość izolacji bakteriofagów ze środowiska, jednak, co naturalne, większość autorów skupia się przede wszystkim na izolacji fagów o potencjale terapeutycznym (Townsend i wsp., 2021; Sharma i wsp., 2021; Ghaznavi-Rad i wsp., 2022). W ramach prowadzonych badań wykazano możliwość zastosowania fagów celem eliminacji bakterii izolowanych ze środowiska z potwierdzoną obecnością genów związanych z mechanizmami antybiotykooporności [P1]. **Tym samym wskazano, że bakteriofagi mogłyby być wykorzystane nie tylko w celach terapeutycznych ale także jako narzędzia w ograniczaniu rozprzestrzeniania antybiotykoopornych szczepów w środowisku.**

Pierwszy etap prac polegał na izolacji bakteriofagów ze środowiska trzody chlewnej. Fagi były izolowane z prób środowiskowych pochodzących zarówno z chlewni komercyjnych jak i hodowli przy gospodarstwach domowych znajdujących się na terenie Polski. Wyizolowano łącznie 22 bakteriofagi specyficzne do *Escherichia coli*, z czego udało się z efektywnie oczyścić i namnożyć 17 wirusów bakteryjnych. Kolejny etap badań wykonano we współpracy z zespołem badawczym Prof. Uwe Röslera podczas realizacji czteromiesięcznego stażu naukowego, częściowo finansowanego w formie stypendium przez Niemiecką Centralę Wymiany Akademickiej (*Deutscher Akademischer Austauschdienst, DAAD*). Aktywność wyizolowanych wirusów była testowana wobec 104 szczepów ESBL/AmpC *E. coli*, czyli bakterii zawierających w swoich genomach geny kodujące β -laktamazy o

rozszerzonym spektrum działania oraz β -laktamazy AmpC. Enzymy te są wytwarzane przez przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* i warunkują odporność na wiele związków z grupy antybiotyków β -laktamowych w tym penicylin, cefalosporyn i monobaktamów. Testowane szczepy zostały pozyskane ze środowiska trzody chlewnej. Bakterie były izolowane z ferm hodowlanych znajdujących się na terenie Niemiec, przy czym należy podkreślić, iż szczepy te były pozyskane ze środowiska zwierząt zdrowych. Spektrum aktywności uzyskanych fagów wobec testowanych szczepów różniło się dla poszczególnych wirusów i wynosiło od 1.9% (BF14) do 57.7% (BF17). Co ciekawe, jedynie 18 ze 104 testowanych szczepów nie było wrażliwych na żadnego faga co stanowi 17.3% szczepów bakteryjnych stosowanych w badaniach. Na podstawie analizy spektrum aktywności pojedynczych fagów zaproponowano koktajl fagowy, który jest zdolny do eliminacji 80.8% testowanej puli szczepów. Bakteriofagi BF9, BF15 i BF17 wyselekcjonowane jako składniki koktajlu zostały następnie scharakteryzowane pod kątem morfologii, oddziaływań z gospodarzem bakteryjnym oraz wpływu temperatury i pH na ich aktywność. Ponadto ich genomy zostały zsekwencjonowane, po czym została przeprowadzona analiza filogenetyczna oraz analiza genomu [P2].

Analiza zdjęć wykonanych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) pozwoliła na zaklasyfikowanie fagów BF9, BF15 i BF17 do klasy *Caudoviricetes*. Wielkość genomu znacząco się różniła dla poszczególnych fagów, od 44,963 pz dla BF9, 167,801 pz dla BF15 i 383,493 pz dla bakteriofaga BF17 (P2, Tabela S1). Analiza filogenetyczna przeprowadzona dla bakteriofaga BF9 pozwoliła na przyporządkowanie tego wirusa do rodzaju *Dhillonvirus*. Fagi tego rodzaju wykazują morfologię sifowirusów i charakteryzują się zdolnością do infekowania przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae*. Analiza porównawcza sekwencji genomowych wykazała wysokie podobieństwo BF9 do bakteriofaga vB_EcoS_bov22_1 (MT884014) oraz, w mniejszym stopniu, do bakteriofaga HK578 (JQ086375) (P2, Rys. 2). BF15 został zaklasyfikowany do rodzaju *Tequatrovirus*. Jest to grupa wirusów bardzo dobrze scharakteryzowana. Fagi tej grupy są powszechnie izolowane ze środowiska, są to fagi wirulentne, co jest jednym z elementów wskazujących na bezpieczeństwo ich stosowania. Genom faga BF15 wykazywał najwyższy stopień homologii z genomami fagów UFV-AREG1 (KX009778.1), PEC04 (KR233165.1) oraz HY01 (KF925357.1) (P2, Rys. 3). Analiza bazy danych VICTOR pozwoliła na przyporządkowanie faga BF17 do odrębnego klastra fagów

specyficznych do *E. coli* (**P2, Rys. 4**). Fagi należące do tej grupy zaliczane są do rodzaju *Asteriusvirus* i charakteryzują się wielkością genomu przekraczającą 200 tpz. Warto podkreślić, że fagi o tak dużych genomach są klasyfikowane w obrębie wielu rodzajów taksonomicznych, stąd wnioskować można o ich niezależnym ewolucyjnym powstaniu. Zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego Komitetu Taksonomii Wirusów (*International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV*), 70% zgodność sekwencji genomu faga BF17 z innymi przedstawicielami rodzaju *Asteriusvirus* uzasadnia zaklasyfikowanie go do wskazanej grupy. W przeciwieństwie do BF9 i BF15, bakteriofag BF17 wykazuje nietypową organizację genomu, co jest często spotykane u fagów typu „jumbo”. Genomy wszystkich fagów przeanalizowano pod kątem występowania genów kodujących określone białka. Zidentyfikowane białka sklasyfikowano ze względu na ich funkcjonalność na (i) białka związane z replikacją DNA, transkrypcją, translacją i metabolizmem nukleotydów (ii) białka strukturalne i związane z morfogenezą (iii) białka związane z lizą komórki gospodarza (iv) białka systemu restrykcji-modyfikacji (v) białka pełniące inne niż wyżej wymienione funkcje (**P2, Tabela S2**). **Co istotne, w genomach żadnego z fagów nie wykryto genów toksyczności, wirulencji, antybiotykoodporności ani lizogenii.**

Wszystkie bakteriofagi wykazywały efektywność w eliminacji bakterii *in vitro* przy zastosowaniu różnych wartości MOI (*multiplicity of infection*) (**P2, Fig. 5**). Również wszystkie fagi zachowywały aktywność po okresie inkubacji w temperaturach -20°C - 40°C. Ponadto bakteriofagi BF9 i BF17 inkubowane w temperaturze 50°C także zachowywały częściową zdolność do eliminacji bakterii (**P2, Fig. 6**). Fagi BF9, BF15 oraz BF17 wykazywały stabilność w pH 5-9. Dodatkowo, fag BF17 częściowo zachowywał aktywność po inkubacji w pH 11 i pH 3 (**P2, Rys. 7**). **Stabilność bakteriofagów BF9, BF15 oraz BF17 w szerokim spektrum temperatury i pH potwierdza potencjał aplikacyjny tych wirusów.**

W kolejnym etapie prac sprawdzano aktywność wszystkich wyizolowanych wcześniej 17 bakteriofagów względem szczepów ESBL/AmpC *E. coli* pozyskanych z hodowli indyków. Co ciekawe, spektrum lityczne większości fagów (14 z 17 testowanych fagów) było szersze względem szczepów izolowanych z tego środowiska niż ze środowiska trzody chlewnej. Należy jednak podkreślić, że izolaty bakteryjne z tych dwóch środowisk ze względu na ich dużą ilość nie były na tym etapie prac porównywane pod względem genetycznym i nie można wykluczyć, iż w badanych pulach bakterii testowano identyczne szczepy. Jedynie 11 szczepów bakteryjnych nie

było wrażliwych na żadnego faga co stanowi 21.6% wszystkich szczepów (**P1, Rys. 1**).

Rezultatem przeprowadzonych badań jest wskazanie nowych możliwości zastosowania bakteriofagów izolowanych ze środowiska w zakresie wpływu na dynamikę rozwoju populacji bakteryjnej. Bakteriofagi mogą nie tylko być stosowane wobec szczepów patogennych ale również szczepów niosących geny antybiotykooporności, tym samym przyczyniając się do ograniczania rozprzestrzeniania się tych bakterii w środowisku. Warto jednak podkreślić, że badania te wymagają kontynuacji z uwzględnieniem wielu aspektów takich jak znaczenie zjawiska fagooporności, możliwość potencjalnego transferu przez fagi również genów antybiotykooporności oraz wszechstronnego wpływu preparatu na dany ekosystem. **Ponadto wykazano, że bakteriofagi o potencjale aplikacyjnym wpisujące się w zaproponowaną strategię mogą być w łatwy sposób izolowane ze środowiska naturalnego.** Fagi specyficzne do danego szczepu bakterii mogą być izolowane z odległych miejsc, co przekładając na aspekt terapeutyczny oznacza, że przygotowanie skutecznego preparatu nie wymaga dostępu do ogniska zakażenia. Bakteriofagi mogą być również izolowane z innych środowisk niż docelowy szczep bakteryjny, jako, że wirusy aktywne wobec szczepów izolowanych z hodowli indyków zostały pozyskane z ferm trzody chlewnej.

Niewątpliwie bakteriofagi mają zdolność do swobodnego rozprzestrzeniania się w środowisku czym można uzasadnić możliwość izolacji tych wirusów z odległych miejsc i różnych ekosystemów. Ciekawe wydaje się natomiast, że istnieje tendencja do łatwiejszej izolacji fagów właśnie z odległych miejsc i środowisk aniżeli z tej samej lokalizacji co izolaty bakteryjnych gospodarzy. Obserwacje takie miały miejsce już na etapie izolacji bakteriofagów. Obecność fagów w próbach środowiskowych była testowana wobec szczepów izolowanych także ze wszystkich prób. Większość, czyli 18 z 22 bakteriofagów została wyizolowana z innych miejsc niż ich bakteryjni gospodarze. Tak jak wspomniano wcześniej, również większość fagów izolowanych ze środowiska trzody chlewnej była bardziej aktywna wobec szczepów izolowanych z hodowli indyków, a więc z innego środowiska. Obserwacje te wymagają przeprowadzenia szerokich badań z uwzględnieniem dużej ilości prób z różnych obszarów geograficznych i środowisk, niemniej jednak można przypuszczać, iż rzeczywiście taka zależność może mieć miejsce. Oczywiście jest, że fagi bytujące w określonym środowisku eliminują wrażliwe na nie szczepy, stąd trudność pozyskania

gospodarza bakteryjnego z tej samej lokalizacji. Hipotetycznie, występowanie tego zjawiska można uzasadniać również tym, że bakterie bytujące w tym samym siedlisku co fagi, w naturalny sposób wykształcają mechanizmy oporności przeciwko tym wirusom. W przeciwieństwie do nich, bakterie z odległych miejsc nie wykształciły takich mechanizmów, stąd wykazują wrażliwość na infekujące bakteriofagi.

Warto przeanalizować jeszcze jeden aspekt zastosowanej w niniejszych badaniach techniki izolacji bakteriofagów. Często, aby zwiększyć efektywność tego procesu stosuje się tzw. metodę „*on-demand*”, czyli technikę polegającą na przygotowaniu hodowli szczepu, do którego poszukiwany jest aktywny fag. Do tej hodowli dodawana jest następnie próba środowiskowa. Założenie tej procedury jest takie, że jeśli specyficzny fag jest obecny w hodowli, będzie się namnażał na wrażliwym szczepie bakteryjnym. **Przeprowadzone badania wskazują, że zastosowanie tej techniki nie jest konieczne a aktywne fagi mogły być w łatwy sposób izolowane z wykorzystaniem innych gospodarzy.** Celem sprawdzenia tej teorii, za pomocą metody „*on-demand*” przygotowano preparat o potencjalnej aktywności przeciwko szczepom izolowanym ze środowiska hodowli indyków. Była to ta sama pula 51 szczepów, która została wykorzystana na wcześniejszym etapie badań. Do wspólnej hodowli wszystkich szczepów dodano próby środowiskowe pozyskane z ferm indycznych. Zastosowanie metody „*on-demand*” pozwoliło na uzyskanie filtratu, wykazującego aktywność lityczną wobec 80.4% testowanych szczepów. Dla porównania, analiza spektrum aktywności poszczególnych fagów izolowanych z polskich ferm trzody chlewnej pozwoliła na uzyskanie 3-składnikowego koktajlu o nieznacznie mniejszym spektrum aktywności wynoszącym 78%. Warto dodać, że z filtratu uzyskanego za pomocą metody „*on-demand*” nie izolowano poszczególnych bakteriofagów i nie można wykluczyć, iż stanowi on mieszaninę wielu wirusów. Według mojej wiedzy porównanie efektywności metody „*on-demand*” z innymi technikami izolacji fagów nie było nigdy wcześniej przedmiotem doniesień naukowych.

W mojej ocenie badania przedstawione w niniejszej części cyklu mają duże znaczenie poznawcze. Wykazano, że potencjalne zastosowanie fagów izolowanych ze środowiska nie jest ograniczone do celów bezpośrednio związanych z prewencją lub eliminacją zakażeń bakteryjnych, ale może również stanowić element strategii zwalczania zjawiska antybiotykooporności w populacjach bakteryjnych określonych ekosystemów. Biorąc pod uwagę alarmujący trend związany z rozprzestrzenianiem się

antybiotykoopornych szczepów w środowisku, można uznać, że badania te wpisują się w obszar badawczy o kluczowym znaczeniu.

Należy podkreślić, że rezultaty przedstawionych badań stanowią także znaczący wkład w obszar nauk podstawowych. Wyizolowano 17 bakteriofagów, przy czym scharakteryzowano trzy bakteriofagi BF9, BF15 i BF17, mogące potencjalnie stanowić składniki koktajlu przeciwko szczepom ESBL/AmpC *E. coli*. Bakteriofagi zostały scharakteryzowane pod względem morfologii, oddziaływań z bakteryjnym gospodarzem oraz stabilności w szerokim zakresie temperatury i pH. Ponadto genomy tych fagów zostały zsekwencjonowane i scharakteryzowane. **BF9, BF15 i BF17 są to fagi unikatowe, nie opisane dotychczas w literaturze, stąd można stwierdzić, iż przeprowadzone badania w istotny sposób poszerzają wiedzę z zakresu biologii bakteriofagów.**

W pracach przedstawionych w tej części cyklu poruszony jest także aspekt praktyczny izolacji nowych fagów ze środowiska, w szczególności skuteczność metody „on-demand” w porównaniu z metodą izolacji z wykorzystaniem innych szczepów niż docelowe. Należy dodać, że jest to tematyka, na której publikacje naukowe dotyczące bakteriofagów skupiają się niezmiernie rzadko, choć niewątpliwie proces technologiczny przygotowywania preparatów fagowych ma znaczenie fundamentalne. Mimo, iż podjęte prace wymagają kontynuacji, w mojej ocenie stanowią one inspirację do dalszych badań mających na celu sprawdzenie ich funkcjonalności i możliwości potencjalnego praktycznego zastosowania.

Wnioski:

- Wyznaczono nowe perspektywy zastosowania bakteriofagów izolowanych ze środowiska w zakresie rozwoju dynamiki populacji bakteryjnej.
- Wykazano, że w łatwy sposób można wyizolować bakteriofagi o potwierdzonym potencjale aplikacyjnym wpisujące się w zaproponowaną strategię.
- Opracowano koktajl składający się z trzech fagów BF9, BF15 i BF17 o szerokim spektrum aktywności wobec szczepów ESBL/AmpC *E. coli*.
- Przedstawiono charakterystykę trzech nie znanych dotychczas bakteriofagów BF9, BF15 i BF17.

- Potwierdzono, iż aktywne bakteriofagi mogą być izolowane z odległych miejsc oraz innych środowisk niż ich bakteryjni gospodarze.
- Wykazano, że nie jest konieczne stosowanie metody „on-demand” celem efektywnej izolacji bakteriofagów aktywnych wobec docelowych szczepów bakteryjnych.

2. Komentarz do publikacji: Namnażanie wirusów bakteryjnych [P3]

[P3] Skaradzińska A. i wsp. (2020) Bacteriophage amplification – a comparison of selected methods. *J Virol Methods*. 282:113856. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113856 (IF_{JCR} = 2,014; MNiSW = 70 p)

Namnażanie bakteriofagów jest procedurą wykonywaną rutynowo w każdym laboratorium zajmującym się pracą z tymi wirusami. Mimo, iż jest to metoda powszechnie przeprowadzana, trudno jest znaleźć dane literaturowe dotyczące optymalizacji tej techniki. Co istotne, analizując część metodyczną publikacji, w których bakteriofagi są stosowane, można wysnuć wniosek, że jest to technika wykonywana w nieco odmienny sposób w poszczególnych zespołach badawczych.

Optymalizacja procedur namnażania wirusów bakteryjnych jest niezwykle istotna nie tylko z punktu widzenia praktyki laboratoryjnej ale także komercjalizacji preparatów fagowych. Ponadto warto także podkreślić, że w preparatach płynnych z czasem miano fagów spada, co pociąga za sobą konieczność kontroli tego miana oraz namnażania fagów gdy ten spadek jest znaczący. Jest to uciążliwe zwłaszcza w przypadku utrzymywania kolekcji fagowych składających się z kilkudziesięciu lub kilkuset wirusów. Możliwość pozyskiwania preparatów o wysokim mianie faga niewątpliwie korzystnie wpłynęłaby na ten aspekt, który jest kluczowy przy pracy z wirusami bakteryjnymi.

Celem przeprowadzonych badań była analiza najczęściej stosowanych metod namnażania bakteriofagów oraz poszukiwanie prostej, uniwersalnej metody amplifikacji wirusów bakteryjnych, która umożliwiłaby uzyskiwanie preparatów o wysokim mianie faga bez konieczności ich zagęszczania.

Pierwszym etapem prac była analiza danych literaturowych i wytypowanie pięciu metod namnażania bakteriofagów najczęściej stosowanych przez badaczy zajmujących się wirusami bakteryjnymi (**P3, Tabela 2**). Należy podkreślić, że częściowo przy

optymalizacji protokołów opierano się także na doświadczeniu laboratoryjnym autorów niniejszej pracy.

Pierwszą wyselekcjonowaną metodą była **metoda namnażania z pojedynczych łąsinek**. Metoda ta została zaproponowana przez Adams (1959) i była następnie stosowana w latach późniejszych m.in. przez Fortnier i Moineau (2009). Technika ta polega na przygotowaniu płytki z pojedynczymi łąsinkami na murawie bakteryjnej szczepu gospodarza. Wybrane łąsinki są następnie nakłuwane za pomocą jałowej końcówki od pipety lub wykałaczki i materiał biologiczny jest przenoszony do płynnego podłoża. Hodowla jest następnie inkubowana przez 24 godz. przy delikatnym wstrząsaniu (250 rpm) w temperaturze 37°C, po czym filtrowana celem usunięcia komórek, które nie uległy lizie. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy (**P3**) wszystkie modele eksperymentalne, obejmowały dodatkowy etap, w którym lizat uzyskany po namnażaniu fagów, przed etapem filtracji, jest przechowywany przez 20 godz. (*overnight*) w temperaturze -80°C. Założono, że uwzględnienie takiego etapu może w dużym stopniu w praktyce ułatwić pracę.

Druga z zaproponowanych metod to **metoda zmywu powierzchniowego** (Mesquita i wsp., 2010). Podobnie jak w metodzie poprzedniej, pierwszym etapem prac jest uzyskanie płytki z murawą bakteryjną z pojedynczymi łąsinkami. Na powierzchnię płytki nanoszone jest następnie 2.5 ml podłoża Luria Bertani (LB), po czym płytka jest zabezpieczana parafilmem, umieszczana na kołysce laboratoryjnej i inkubowana przez 20 min. w 37°C. Po okresie inkubacji, płyn jest zlewany a jego objętość uzupełniana do 10 ml, po czym hodowla jest ponownie inkubowana w 37°C przez 24 godz.. Tak jak w przypadku omawianej wcześniej metody namnażania z pojedynczych łąsinek, podczas realizacji prac eksperymentalnych, po inkubacji hodowla była przechowywana przez 20 godz. w -80°C i po rozmrożeniu filtrowana.

Metoda agarowa została zaproponowana przez Adams (1959) i jest ona obecnie zamieszczona na stronie Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Tkankowych (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ*) jako metoda rekomendowana do namnażania fagów pochodzących właśnie z tej kolekcji. Warstwa agaru z płytki uzyskanej analogicznie jak w przypadku dwóch poprzednio omawianych metod jest usuwana za pomocą jałowego skalpela i przenoszona do 25 ml LB, po czym całość jest inkubowana w 37°C przez 20 min. i wirowana (4000 rpm, 10 min.). Supernatant jest następnie inkubowany przez 24 godz. w temperaturze 37°C (250 rpm). Również w przypadku tej metody zastosowano

model eksperymentalny z uwzględnieniem etapu przechowywania preparatu z namnożonymi fagami przez okres 20 godz. w temperaturze -80°C . Uzyskana hodowla była następnie po rozmrożeniu filtrowana.

W **metodzie dwuetapowej** (Oliveira i wsp., 2009) do 12-godzinnej hodowli bakteryjnego gospodarza jest dodawany preparat fagowy, po czym wspólna hodowla faga i bakterii jest następnie inkubowana przez 24 godz. w temperaturze 37°C (250 rpm). Po inkubacji hodowla jest filtrowana a uzyskany filtrat przenoszony jest do przygotowanej 16 godz. wcześniej hodowli bakteryjnej. Nowa hodowla jest następnie inkubowana przez 24 godz. w 37°C (250 rpm). Uzyskany według tej procedury lizat był następnie przechowywany przez kolejne 20 godz. w -80°C po czym po rozmrożeniu filtrowany.

Ostatnia z zaproponowanych metod polega na **namnażaniu bakteriofagów w hodowli płynnej gospodarza**, przy jednoczesnym monitorowaniu gęstości optycznej tejże hodowli (OD_{600}). Metoda ta była i jest standardowo wykonywana przez zespół naukowy przygotowujący niniejszą publikację (**P3**). Gęstość optyczna wspólnej hodowli faga i bakterii (10 ml) jest monitorowana co godzinę. Jeśli OD_{600} wzrasta powyżej wartości 0.5 (brak efektywnej eliminacji bakterii przez faga), dodawany jest 1 ml preparatu fagowego, jeśli natomiast wartość OD_{600} spada poniżej wartości 0.5 (efektywna liza bakterii przez faga), dodawany jest 1 ml 3-godzinnej hodowli bakteryjnej gospodarza. Hodowla prowadzona jest łącznie przez 6 godzin, po czym poddawana działaniu temperatury -80°C przez 20 godz. a następnie po rozmrożeniu filtrowana.

Następny etap badań polegał na wyselekcjonowaniu 15 bakteriofagów o zróżnicowanej morfologii, specyficzności i cyklu rozwojowym (**P3, Tabela 1**). Wszystkie fagi były namnażane z wykorzystaniem pięciu przedstawionych wcześniej metod. Mianem początkowym stosowanym w procesie namnażania było 1×10^4 pfu/ml. Warto podkreślić, że w testowanej puli fagów znalazły się trzy fagi wyizolowane przez autorów pracy z otoczenia człowieka. Bakteriofag TO1+6 F został wyizolowany z toalety, TO1+7 F z gąbki do mycia naczyń a fag LO5+1F z lodówki. Mimo, iż badania dotyczące izolacji tych fagów nie wchodzą bezpośrednio w zakres tematyczny cyklu, niewątpliwie stanowią one istotny element poznawczy i potwierdzają wszechobecność wirusów bakteryjnych i ich bezpośredni, powszechny kontakt z człowiekiem.

Na podstawie analizy uzyskanych wyników (**P3, Rys. 1**) można stwierdzić, że dla każdego faga inna technika namnażania okazała się najbardziej efektywna. Niemniej jednak, **wszystkie zaproponowane metody pozwoliły, w większości przypadków, na uzyskanie stosunkowo wysokiego miana fagów w lizacie.** Warto podkreślić, że zagadnienie namnażania bakteriofagów jest tematem niezwykle złożonym i niniejszą pracę należy postrzegać jako wstępny etap obszernych prac dotyczących tej problematyki.

Istnieje wiele czynników, które mogą mieć wpływ na namnażanie fagów (np. dostępność tlenu, zastosowany czas oraz objętość hodowli, temperatura, pH). Dla każdej z zaproponowanych metod istnieje więc szereg parametrów mogących podlegać dalszej optymalizacji. Ponadto wiele cech morfologicznych zarówno bakteriofagów jak i bakterii może mieć również wpływ na namnażanie tych wirusów. Należy zaznaczyć, że w ramach niniejszych prac nie uwzględniano parametru MOI, który ma bezpośredni związek z namnażaniem fagów. Celem pracy było jednak poszukiwanie metod uniwersalnych, nie wymagających przeprowadzenia wcześniejszej charakterystyki fagów.

W przypadku każdej z zaproponowanych procedur namnażania fagów zastosowano dodatkowo etap mrożenia poprzedzający filtrację. Jest to etap w dużej mierze mogący ułatwić pracę z wirusami bakteryjnymi. W dodatkowych eksperymentach wykazano, że proces mrożenia może mieć różny wpływ na aktywność poszczególnych fagów (**P3, Tabela S2**). W przypadku 7 z 15 wirusów, nie zaobserwowano istotnych zmian po przechowywaniu przez 20 godz. w -80°C , natomiast w pozostałych przypadkach spadek wynosił około 1 rzędu (pfu/ml). Wyjątkiem w całej puli testowanych fagów był fag Phi29 specyficzny do *Bacillus subtilis*, którego aktywność w wyniku mrożenia spada o dwa rzędy (pfu/ml). Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę przeprowadzenia szerokich badań dotyczących wpływu mrożenia na aktywność fagów.

Podsumowując, badania przedstawione w tej części cyklu skupiają się na analizie porównawczej ogólnie przyjętych metod namnażania bakteriofagów. Walidacja tych metod jest szczególnie ważna zarówno w kontekście komercjalizacji fagów, jak i z punktu widzenia praktyki laboratoryjnej, kiedy to konieczność częstego namnażania wirusów jest dodatkowym utrudnieniem pracy. Mimo, iż przedstawione badania mają charakter wstępny, według mojej wiedzy jest to jedyna praca dostępna w literaturze, gdzie temat namnażania bakteriofagów został przedstawiony w tak szerokim ujęciu.

Wnioski:

- Dla każdego faga inna z zaproponowanych technik namnażania wirusów bakteryjnych okazała się najbardziej efektywna. Niemniej jednak, wszystkie zaproponowane metody pozwoliły, w większości przypadków, na uzyskanie stosunkowo wysokiego miana fagów w lizacie.
- Dla bakteriofagów takich jak m.in. T4, λ, Felix, Twort, wykorzystywanych przez wiele zespołów naukowych jako modele badawcze wskazano najefektywniejsze techniki namnażania spośród metod zaproponowanych i testowanych w pracy. Badacze pracujący z tymi wirusami mogą więc bezpośrednio korzystać z przedstawionych wniosków.
- Zaproponowano metodę namnażania bakteriofagów opartą o pomiary gęstości optycznej wspólnej hodowli faga i jego bakteryjnego gospodarza. Metoda ta okazała się najbardziej efektywna m.in. dla fagów T4 i λ, powszechnie wykorzystywanych przez naukowców w wielu ośrodkach badawczych.
- Wskazano te etapy poszczególnych metod, które mogą ulegać dalszej optymalizacji a także wskazano na właściwości bakteriofagów i bakterii, które mogą mieć wpływ na namnażanie tych wirusów.
- Wykazano, że przechowywanie fagów w temperaturze -80°C przez 20 godzin może mieć różny wpływ na aktywność wirusów bakteryjnych. Spośród przetestowanej puli fagów, maksymalny spadek miana zaobserwowano dla faga Phi29 i wynosił on około dwa rzędy (pfu/ml).
- Mimo, iż izolacja fagów z otoczenia człowieka nie wchodzi bezpośrednio w zakres tematyczny cyklu, pozyskanie trzech fagów: TO1 + 6 F, TO1 + 7F oraz LO5+1F stanowi również dodatkowe osiągnięcie podjętych badań. Izolacja tych fagów potwierdza powszechny, bezpośredni kontakt człowieka z wirusami bakteryjnymi.

3. Komentarz do publikacji: Stabilizacja bakteriofagów [P4-P6]

[P4] Skaradzińska A. i wsp. (2018) Potential application of lyophilization in commercial use of bacteriophage preparations in veterinary medicine. *Slov Vet Res.* 55:73-80. doi:10.26873/SVR-396-2017 (IF_{JCR} = 0,17; MNiSW = 20 p)

[P5] Choińska-Pulit A. i wsp. (2015) Bacteriophage encapsulation: trends and potential applications. *Trends Food Sci Technol.* 5:327-349. doi:10.1016/j.tifs.2015.07.001 (IF_{JCR} = 5,15; MNiSW = 50 p)

[P6] Śliwka P. i wsp. (2019) Encapsulation of bacteriophage T4 in mannitol-alginate dry microspheres and survival in simulated gastrointestinal conditions. *LWT Food Sci Technol.* 99:238-243. doi:10.1016/j.lwt.2018.09.043 (IF_{JCR} = 3,714; MNiSW = 40 p)

Bakteriofagi stanowią byty biologiczne o bardzo dużej wrażliwości na czynniki środowiskowe takie jak dehydratacja otoczenia, wysoka temperatura lub skrajne wartości pH (Jończyk i wsp., 2011). Stabilność bakteriofagów możemy rozpatrywać w dwóch aspektach. Pierwszy z nich to wspomniany już aspekt przechowywania preparatów bakteriofagowych. W chwili obecnej najbardziej optymalnym sposobem przechowywania fagów jest przechowywanie w formie płynnych lizatów w temperaturze 4°C. Jako, że miano fagów w czasie spontanicznie spada, sposób ten wymusza konieczność kontrolowania miana i ewentualnego ich namnażania. Jak wspomniano wcześniej, przy dużej ilości preparatów w kolekcji laboratoryjnej jest to niezmiernie uciążliwe, czasochłonne i kosztochłonne. Drugi aspekt stabilizacji bakteriofagów jest powiązany z utratą aktywności tych wirusów w niskim pH. Jest to kwestia szczególnie istotna, jako, że dotyczy to również kwaśnego pH żołądka, w związku z czym najbardziej powszechna droga podania preparatów leczniczych, czyli droga doustna, ma znaczące ograniczenia (Schubert i wsp., 2022). Rozwiązaniem jest przyjmowanie podczas leczenia fagami również środków neutralizujących pH soku żołądkowego, jest to jednak dodatkowe utrudnienie dla pacjenta i komplikacja terapii (Międzybrodzki i wsp., 2017; Dąbrowska, 2019). Opracowywanie nowych i optymalizacja już dostępnych metod stabilizacji preparatów fagowych jest więc szczególnie istotnym kierunkiem badawczym.

Badania przedstawione w publikacjach **P4** i **P6** zostały wykonane we współpracy z zespołem badawczym Laboratorium Bakteriofagowego Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk (IITD, PAN) we Wrocławiu w ramach projektu „Wykorzystanie bakteriofagów do opracowania preparatów stosowanych w hodowli zwierząt przeciwko lekoopornym zakażeniom bakteryjnym” (działanie 1.4 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013; POIG.01.04.00-24-133/11-0), w którym pełniłam rolę kierownika zadania realizowanego przez Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.

Liofilizacja jest procesem często stosowanym celem poprawy stabilności różnych mikroorganizmów (Bond, 2007; Tyutkov i wsp., 2022). Oczywiście wydaje się

zatem sprawdzenie możliwości potencjalnego zastosowania tej metody również celem utrzymania aktywności litycznej bakteriofagów. Mimo, iż istnieje szereg doniesień literaturowych dotyczących liofilizacji wirusów bakteryjnych (Manohar i Ramesh, 2019; Lavenburg i wsp., 2020; Liang i wsp., 2020) wiedza o możliwościach wykorzystania tej techniki wobec fagów jest nadal ograniczona.

W publikacji **P4** zastosowano metodę liofilizacji do stabilizacji trzech bakteriofagów: T4, który jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych fagów, wykorzystywanym często jako fag modelowy, oraz dwóch bakteriofagów o wysokiej aktywności litycznej wobec szczepów *Salmonella* spp. (fag Salm G713) i *Enterococcus* spp. (fag Entc 24). Bakteriofagi Salm G713 i Entc 24 zostały wyizolowane przez zespół naukowy Laboratorium Bakteriofagowego (IITD,PAN) i wchodzi w skład kolekcji fagowej Instytutu. Wszystkie bakteriofagi były liofilizowane w formie lizatu oraz z wykorzystaniem krioprotektantów w postaci odtłuszczonego mleka oraz sacharozy. Badano również możliwość wykorzystania jako czynnika kriochronnego dodatku paszowego, który jest stosowany w hodowli trzody chlewnej i w skład którego wchodzi drożdże *Yarrowia lipolytica* (Yarrowia GoodStart, Skotan S.A., Polska). Ściana komórkowa drożdży składa się w większości z cukrów a wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazują na korzystne działanie tych związków podczas liofilizacji fagów (Puapermpoonsiri i wsp., 2010; Merabishvili i wsp., 2013). Hipoteza badawcza zakładała, że produkt, z którym fagi podawane byłyby zwierzętom, jednocześnie mógłby być wykorzystany celem ich stabilizacji. Tym samym proces produkcji takiego preparatu byłby uproszczony a koszty produkcji obniżone. Po okresach przechowywania wynoszących 10 dni, 1 miesiąc, 3 miesiące, 6 miesięcy i 1 rok (temperatura pokojowa) sprawdzano miano liofilizowanych fagów i porównywano z fagami przechowywanymi w formie lizatu w temperaturze 4°C i w temperaturze pokojowej.

Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowaną wrażliwość bakteriofagów na proces liofilizacji. W przypadku faga T4, mimo iż początkowo zachowywał on aktywność, nawet gdy preparat był liofilizowany bez dodatku krioprotektanta, po roku przechowywania nie wykryto aktywnych fagów. Wykazano, że dodatek sacharozy pozwala na częściowe zachowanie miana przez tego faga (**P5, Tabela 1**). Co ciekawe, fagi Salm G713 i Entc 24 liofilizowane bez dodatku żadnego krioprotektanta, częściowo zachowywały aktywność nawet po roku przechowywania. Odtłuszczone mleko w przypadku faga Salm G713 wykazywało lepsze właściwości

ochronne niż sacharoza i pozwoliło na zachowanie miana o 1.86 log pfu/ml niższego w odniesieniu do grupy kontrolnej (lizat, 4°C) (**P5, Tabela 2**). W przypadku faga Entc 24 sacharoza i mleko odtłuszczone wykazywały porównywalne właściwości ochronne (**P5, Tabela 3**). Zastosowanie dodatku paszowego pozwoliło na częściowe zachowanie miana przez fagi Salm G713 i Entc 24 po roku przechowywania natomiast spadek miana był większy niż przy wykorzystaniu dwóch pozostałych krioprotektantów. W przypadku faga T4, zaobserwowano całkowitą utratę miana przy zastosowaniu dodatku paszowego jako dodatku osłonowego.

Przeprowadzone badania wpisują się w niezwykle istotną tematykę dotyczącą opracowywania metod stabilizacji bakteriofagów. Mimo, iż istnieją prace wskazujące na możliwości zastosowania techniki liofilizacji celem utrwalania preparatów fagowych, niewątpliwie jest to temat bardzo złożony, a efektywność procesu w dużym stopniu zależy nie tylko od rodzaju użytego krioprotektanta ale także od rodzaju wirusa. **Niemniej jednak, technika liofilizacji wykazuje potencjał jako metoda pozyskiwania preparatów w formie suchej umożliwiającej zachowanie stabilności tych wirusów podczas przechowywania.**

Badania przeprowadzone przez nasz zespół badawczy wskazują, że o ile technika liofilizacji może mieć potencjalnie zastosowanie celem pozyskiwania preparatów o zwiększonej stabilności podczas przechowywania, o tyle wykorzystanie tej metody celem uzyskania formuły do podania doustnego ma ograniczone znaczenie, a liofilizowane fagi poddawane działaniu roztworu symulującego środowisko żołądka ulegają całkowitej dezaktywacji (dane nieopublikowane). Celem stabilizacji fagów w kwaśnym pH żołądka, wykorzystywane są inne techniki, w szczególności metody oparte o enkapsulację wirusów bakteryjnych.

Publikacja **P5** stanowi rozszerzony wstęp do części badań dotyczących enkapsulacji bakteriofagów. Według mojej wiedzy jest to jedna z pierwszych jak również i jedna z nielicznych prac przeglądowych w tak kompleksowy sposób prezentująca informacje dotyczące tego zagadnienia. W pracy zdefiniowane są pojęcia kapsułkowania oraz mikrokapsulek, pojęć, które bardzo często w literaturze stosowane są w niejednoznaczny sposób. Ponadto w tej części publikacji przedstawiona jest także klasyfikacja metod enkapsulacji oraz wskazane są najważniejsze zalety tych metod. W kolejnym rozdziale przedstawione są materiały najczęściej stosowane w technikach enkapsulacji. Zasadnicza część artykułu skupia się na najważniejszych metodach enkapsulacji bakteriofagów: emulsyfikacji, ekstruzji, suszeniu rozpyłowym,

zastosowaniu nanowłókien i materiałów opartych o białka serwatkowe. Pracę kończy rozdział, w którym dyskutowane są najważniejsze wyzwania dotyczące systemów immobilizacyjnych bakteriofagów, zwłaszcza w odniesieniu do ich zastosowań w zakresie bezpieczeństwa żywności. Warto podkreślić, że mimo, iż praca została opublikowana w 2015 roku, omawiane w niej metody i zagadnienia są nadal w dużym stopniu aktualne.

Założeniem badań przedstawionych w ostatniej publikacji wchodzącej w skład cyklu (**P6**) było opracowanie formy suchej preparatu fagowego zapewniającej zachowanie aktywności przez fagi nie tylko w określonym czasie przechowywania ale także docelowo w kwaśnym środowisku żołądka. Bakteriofag T4 był utrwalany z wykorzystaniem metody ekstruzji. Fagi były wprowadzane do 2% (w/v) roztworu alginianu sodu, po czym mieszanina była wpuszczana przez igłę o średnicy 0.8 mm do roztworu 0.05 M CaCl₂. Metoda ekstruzji była wielokrotnie wskazywana we wcześniejszych badaniach jako technika umożliwiająca uzyskanie formy preparatu fagowego chroniącej fagi w kwaśnym środowisku żołądka. Większość przeprowadzonych wcześniej prac skupiała się jednak na formach mokrych (Kim i wsp., 2015; Ma i wsp., 2016; Samtlebe i wsp., 2016, Colom i wsp., 2017). W ramach przeprowadzonych badań opracowano metodę uzyskania formy suchej, która, jak podkreślano wcześniej, jest formą bardziej praktyczną zarówno pod względem przechowywania jak i podania. Kluczowy w uzyskaniu suchej formy preparatu fagowego zapewniającej stabilność bakteriofagom okazał się dodatek 0.3 M mannitolu do roztworu CaCl₂. Kapsułki były suszone w przepływie powietrza laminarnego, po czym aktywność fagów była sprawdzana po 1, 7 i 28 dniach przechowywania w temperaturze 23°C. Ten sam model doświadczalny powtórzono następnie dodając jako końcowy etap inkubację preparatu w roztworze symulującym środowisko żołądka (*simulated gastric fluid, SGF*).

W pierwszym etapie prac sprawdzano stabilność fagów wyłącznie w kontekście przechowywania. Zgodnie z oczekiwaniami, zarówno fagi w formie płynnego lizatu jak i immobilizowane fagi w formie mokrej zachowywały aktywność przez cały okres przechowywania. Fagi w formie suchej traciły miano o około 2 log pfu/ml w porównaniu z płynnym lizatem bezpośrednio po procesie kapsułkowania i suszenia a następnie o kolejne 0.46 pfu/ml i 0.87 pfu.ml odpowiednio po tygodniu i miesiącu przechowywania. Końcowe miano fagów przechowywanych w formie

suchej wynosiło 6.90 ± 0.51 log pfu/ml przy początkowym mianie >9 log pfu/ml (**P6, Rys. 2**).

W kolejnym etapie sprawdzano stabilność przechowywanych fagów po inkubacji w soku symulującym środowisko żołądka (SGF). Fagi przechowywane w temperaturze pokojowej zarówno w formie płynnego lizatu jak i formach immobilizowanych były następnie poddawane działaniu soku SGF o pH 2.5 przez okres 60 min. po czym uwalniane w soku symulującym środowisko jelita (pH = 7.5) przez okres 180 min. W przypadku formy mokrej zaobserwowano znaczący spadek miana do wartości 6.78 log pfu/ml w porównaniu z początkowym mianem 9.765 log pfu/ml. Fagi w formie suchej traciły miano w największym stopniu po 1 dniu od momentu enkapsulacji i suszenia (spadek do wartości 6.22 log pfu.ml), przy czym w kolejnych punktach pomiarowych (1 tydzień, 4 tydzień) spadek ten nie był znacząco większy a miano uzyskane po miesiącu przechowywania wynosiło 5.02 log pfu/ml (**P6, Rys. 3**).

Doniesienia literaturowe wskazują na potencjał kapsulek tworzonych z wykorzystaniem alginianu w stabilizacji fagów przy podaniu doustnym (Ma i wsp., 2012; Tang i wsp., 2015; Ma i wsp., 2016; Colom i wsp., 2017). Jak wspomniano wcześniej, przeprowadzone badania skupiają się głównie na formach mokrych, a pozyskiwanie form suchych wymaga, podobnie jak w przypadku procesu liofilizacji, dodatku czynnika osłonowego. Wcześniejsze prace wskazywały na możliwość stosowania takich czynników jak maltoza czy maltodekstryna (Ma i wsp., 2012; Tang i wsp., 2013, Tang i wsp., 2015). Podczas prowadzonych przez nasz zespół naukowy badań najlepsze właściwości ochronne spośród wszystkich testowanych czynników osłonowych (mi.in. trehaloza, maltodekstryna, sacharoza, mannitol, mleko oddtłuszczone) wykazywał mannitol. **Warto podkreślić, że związek ten został w niniejszej pracy po raz pierwszy zastosowany celem uzyskania suchych form preparatów fagowych.** Podstawy działania ochronnego mannitolu wobec fagów nie są znane, przypuszczać jednak można, iż za właściwości te odpowiadają oddziaływania fragmentów cukrowych tego związku z białkami wirionów za pomocą wiązań wodorowych. **Należy zaznaczyć, że mimo, iż preparaty fagowe w formie suchych kapsulek alginianowych były stosowane celem stabilizacji fagów w środowisku żołądka, niniejsza praca po raz pierwszy przedstawia wyniki dotyczące form uprzednio przechowywanych.**

Dobór właściwego nośnika dla wirusów bakteryjnych jest zagadnieniem niezwykle złożonym. Czynniki jakie muszą zostać wzięte pod uwagę przy projektowaniu nośnika to przede wszystkim efektywność zastosowanej metody stabilizacji fagów, ponadto łatwość aplikacji preparatu, opłacalność produkcji, jak również wpływ samego procesu immobilizacji na miano bakteriofagów. **Uzyskane wyniki wskazują, że kapsułki wytworzone z wykorzystaniem alginianu oraz mannitolu mogą być potencjalnie wykorzystane nie tylko celem stabilizacji fagów w formie suchej podczas przechowywania ale także podczas docelowego podania doustnego.**

Wnioski

- Bakteriofagi wykazują duże zróżnicowanie pod względem wrażliwości na proces liofilizacji. Proces ten powinien być optymalizowany odrębnie dla każdego faga, w szczególności pod względem doboru odpowiedniego krioprotektanta.
- Dodatek paszowy oparty o drożdże *Y. lipolytica* ma ograniczone zastosowanie jako krioprotektant w procesie liofilizacji bakteriofagów, choć potencjał tego środka może zostać w pełni określony po przeprowadzeniu szerokich badań z wykorzystaniem zróżnicowanej puli wirusów bakteryjnych.
- Mannitol może stanowić czynnik ochronny w procesie pozyskiwania form suchych preparatów fagowych zarówno celem zwiększenia stabilności tych wirusów podczas przechowywania jak i przy podaniu doustnym u ludzi czy zwierząt.
- Zaproponowano metodę pozwalającą na uzyskanie formy suchej preparatów fagowych zapewniającej zachowanie aktywności litycznej przez fagi po okresie 28 dni przechowywania oraz następnie po podaniu doustnym.

LITERATURA

1. Adams, M.H. (1959) Enumeration of bacteriophage particles. W: Adams, M.H. (Ed.), The Bacteriophages. Inter Science Publ, Nowy Jork, USA, str. 27–30
2. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 99:629-655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
3. Babalova E. G., Katsitadze K. T., Sakvarelidze L. A., Imnaishvili N. S., Sharashidze T. G., Badashvili V. A., Kiknadze G. P., Meipariani A. N., Gendzekhadze N. D., Machavariani E. V., Gogoberidze K. L., Gozalov E. I.,

- Dekanosidze N. G. (1968) Preventive value of dried dysentery bacteriophage. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2:143-145.
4. Bond (2007) Freeze-drying of yeast cultures. *Methods Mol Biol.* 368:99-107. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_6
 5. Cisek A.A., Dąbrowska I., Gregorczyk K.P., Wyżewski Z. (2017) Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. *Curr Microbiol.* 74:277-283. doi:10.1007/s00284-016-1166-x
 6. Colom J., Cano-Sarabia M., Otero J., Ariñez-Soriano J., Cortés P., Maspocho D., Llagostera M. (2017) Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Sci Rep.* 7:41441. doi:10.1038/srep41441
 7. Dąbrowska K. (2019) Phage therapy: what factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Med Res Rev.* 39:2000–2025. doi:10.1002/med.21572
 8. Divya Ganeshan S., Hosseinidoust Z. (2019) Phage therapy with a focus on the human microbiota. *Antibiotics (Basel)* 8:131. doi:10.3390/antibiotics8030131
 9. Domingo-Calap P., Delgado-Martínez J. (2018) Bacteriophages: Protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics (Basel)* 7:66. doi:10.3390/antibiotics7030066
 10. Esteves N.C., Scharf B.E. (2022) Flagellotropic bacteriophages: opportunities and challenges for antimicrobial applications. *Int J Mol Sci.* 23:7084. doi:10.3390/ijms23137084
 11. Fortnier L.C., Moineau S. (2009) Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. *Methods Mol Biol.* 501:203-219. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_19
 12. Garvey M. (2022) Bacteriophages and food production: biocontrol and bio-preservation options for food safety. *Antibiotics (Basel)* 11:1324. doi:10.3390/antibiotics11101324
 13. Ghaznavi-Rad E., Komijani M., M oradabadi A., Rezaei M., Shaykh-Baygloo N. (2022) Isolation of a lytic bacteriophage against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections and its dramatic effect in rat model of burn infection. *J Clin Lab Anal.* 36:e24497. doi:10.1002/jcla.24497
 14. d'Herelle F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *C R Acad Sci.* 165:373-375
 15. Jończyk E., Kłak M., Międzybrodzki R., Górski A. (2011) The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol.* 56:191–200. doi:10.1007/s12223-011-0039-8
 16. Kim S., Jo A., Ahn, J. (2015) Application of chitosan-alginate microspheres for the sustained release of bacteriophage in simulated gastrointestinal conditions. *IFSET.* 50:913–918. doi:10.1111/ijfs/12736
 17. Kortright K.E., Chan B.K., Koff J.L., Turner P.E. (2019) Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe.* 25:219-232. doi:10.1016/j.chom.2019.01.014
 18. Kostrzewski J., Mulczyk M., Slopek S. (1974) Prevention of dysentery infections in human collectivities by means of polyvalent bacteriophages *S. flexneri* and *S. sonnei*. *Przegl Epidemiol.* 28:483-507.
 19. Lavenburg V.M., Liao Y.T., Salvador A., Hsu A.L., Harden L.A., Wu V.C.H. (2020) Effects of lyophilization on the stability of bacteriophages against different serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Cryobiology* 96:85-91. doi:10.1016/j.cryobiol.2020.07.012
 20. Liang L., Carrigy N.B., Kariuki S., Muturi P., Onsare R., Nagel T., Vehring R., Connerton P.L., Connerton I.F. (2020) Development of a lyophilization process for *Campylobacter* bacteriophage storage and transport. *Microorganisms* 8:282. doi:10.3390/microorganisms8020282
 21. Loc-Carrillo C., Abedon S.T. (2011) Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 1:111–114. doi:10.4161/bact.1.2.14590
 22. Ma Y., Pacan J. C., Wang Q., Sabour P. M., Huang X., Xu Y. (2012) Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing staphylococcus aureus intestinal carriage. *Food Hydrocoll.* 26:434–440. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.11.017
 23. Ma Y.-H., Islam G. S., Wu Y., Sabour P. M., Chambers J. R., Wang Q., Wu S.X.Y., Griffiths M. W. (2016) Temporal distribution of encapsulated bacteriophages during passage through the chick gastrointestinal tract. *Poult Sci.* 95:2911-2920. doi:10.3382/ps/pew260
 24. Mahoney A.R., Safae M.M., Wuest W.M., Furst A.L. (2021) The silent pandemic: emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2. *iScience* 24:102304. doi:10.1016/j.isci.2021.102304
 25. Manohar P., Ramesh N. (2019) Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Sci Rep.* 9:15242. doi:10.1038/s41598-019-51742-4
 26. Mencke J.L., He Y., Filippov A.A., Nikolich M.P., Belew A.T., Fouts D.E., McGann P.T., Swierczewski B.E., Getnet D., Ellison D.W., Margulieux K.R. (2022) Identification and characterization of vB_PreP_EPr2, a lytic bacteriophage of pan-drug resistant *Providencia rettgeri*. *Antibiotics* 14:708. doi:10.3390/v14040708
 27. Mendelson M., Sharland M., Mpundu M. (2022) Antibiotic resistance: calling time on the “silent pandemic”. *JAC Antimicrob Resist.* 4:d1ac016. doi:10.1093/jacamr/d1ac016
 28. Merabishvili M., Vervaeck C., Pirnay J.-P., De Vos D., Verbeken G., Mast J., Chanishvili N., Vaneechoutte M. (2013) Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freeze-drying (lyophilization). *PLoS One* 8:e68797. doi:10.1371/journal.pone.0068797
 29. Mesquita M.M.F., Stimson J., Chae G.T., Tufenkji N., Ptacek C.J., Blowes D.W., Emelko M.B. (2010) Optimal preparation and purification of PRD1-like bacteriophages for use in environmental fate and transport studies. *Water Res.* 44:1114-1125. doi:10.1016/j.watres.2009.11.017
 30. Merrill C.R., Biswas B., Carlton R., Jensen N.C., Creed G.J., Zullo S., Adhya S. (1996) Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3188-3192. doi:10.1073/pnas.93.8.3188

31. Międzybrodzki R., Kłak M., Jończyk-Matysiak E., Bubak B., Wójcik A., Kaszowska M., Weber-Dąbrowska B., Łobocka M., Górski A. (2017) Means to facilitate the overcoming of gastric juice barrier by a therapeutic staphylococcal bacteriophage A5/80. *Front Microbiol.* 8:467. doi:10.3389/fmicb.2017.00467
32. Moghadam M.T., Khoshbayan A., Chegini Z., Farahani I., Shariati A. (2020) Bacteriophages, a new therapeutic solution for inhibiting multidrug-resistant bacteria causing wound infection: lesson from animal models and clinical trials. *Drug Des Devel Ther.* 14:1867–1883. doi:10.2147/DDDT.S251171
33. Mulczyk M., Slopek S. (1974) Use of a new phage preparation in prophylaxis and treatment of shigellosis. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 21:115-119
34. Oliveira A., Sereno R., Nicolau A., Azeredo J. (2009) In vivo toxicity study of phage lysate in chickens. *Brit Poult Sci.* 50:558-563. doi:10.1080/00071660903141013
35. Puapermpoonsiri U., Ford S.J., van der Walle C.F. (2010) Stabilization of bacteriophage during freeze drying. *Int J Pharm.* 389:168-75. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.01.034
36. Ryan E.M., Gorman S.P., Donnelly R.F., Gilmore B.F. (2011) Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J Pharm Pharmacol.* 63:1253-1264. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01324.x
37. Samtlebe M., Ergin F., Wagner N., Neve H., Küçükçetin A., Franz C. M. A. P., Heller K.J., Hinrichs J., Atamer Z. (2016) Carrier systems for bacteriophages to supplement food systems: encapsulation and controlled release to modulate the human gut microbiota. *LWT Food Sci Technol.* 68:334–340. doi:10.1016/j.lwt.2015.12.039
38. Schubert C., Fischer S., Dorsch K., Teßmer L., Hinrichs J., Atamer Z. (2022) Microencapsulation of bacteriophages for the delivery to and modulation of the human gut microbiota through milk and cereal products. *Appl Sci.* 12:6299. doi:10.3390/app12136299
39. Sharma S., Datta S., Chatterjee S., Dutta M., Samanta J., Vairale M.G., Gupta R., Veer V., Dwivedi S.K. (2021) Isolation and characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 11:19393. doi:10.1038/s41598-021-98457-z
40. Smith H. W., Huggins, M. B. (1982) Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol.* 128:307–318. doi:10.1099/00221287-128-2-307
41. Smith H.W., Huggins M.B. (1983) Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol.* 129:2659-2675. doi:10.1099/00221287-129-8-2659
42. Smith H.W., Huggins M.B., Shaw K.M. (1987) The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophage. *J Gen Microbiol.* 133:1111-1126. doi:10.1099/00221287-133-5-1111
43. Sohail H.A., Coffey A., Dabrowska K., Meyer I.M., Middelboe M., Sohail M., Clokie M.R.J. (2020) Bacteriophages: emerging applications in medicine, food, and biotechnology. *Phage (New Rochelle)* 1:75-82. doi:10.1089/phage.2020.29004
44. Soothill J.S. (1992) Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J Med Microbiol.* 37:258-261. doi:10.1099/00222615-37-4-258
45. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris Jr. J.G. (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:649–659. doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001
46. Tang Z., Huang X., Baxi S., Chambers J. R., Sabour P. M., Wang Q. (2013) Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food Res Int.* 52:460–466. doi:10.1016/j.foodres.2012.12.037
47. Tang Z., Huang X., Sabour P. M., Chambers J. R., Wang Q. (2015) Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. *LWT Food Sci Technol.* 60:263–270. doi:10.1016/j.lwt.2014.08.012
48. Torabi L.R., Doudi M., Naghavi N.S., Monajemi R. (2021) Isolation, characterization, and effectiveness of bacteriophage Pφ-Bw-Ab against XDR *Acinetobacter baumannii* isolated from nosocomial burn wound infection. *Iran J Basic Med Sci.* 24:1254-1263. doi:10.22038/ijbms.2021.57772.12850
49. Townsend E.M., Kelly L., Gannon L., Muscatt G., Dunstan R., Michniewski S., Sapkota H., Kiljunen S.J., Kolsi A., Skurnik M., Lithgow T., Millard A.D., Jameson E. (2021) Isolation and characterization of *Klebsiella* phages for phage therapy. *Phage (New Rochelle)* 2:26-42. doi:10.1089/phage.2020.0046
50. Tyutkov N., Zhernyakova A., Birchenko A., Eminova E., Nadtochii L., Baranenko D. (2022) Probiotics viability in frozen food products. *Food Bioscience* 50:101996. doi:10.1016/j.fbio.2022.101996
51. Wang Z., Zhao X. (2022) The application and research progress of bacteriophages in food safety. *J Appl Microbiol.* 133:2137-2147. doi:10.1111/jam.15555
52. Zuppi M., Hendrickson H.L., O'Sullivan J.M., Vatanen T. (2022) Phages in the gut ecosystem. *Front Cell Infect Microbiol.* 11:822562. doi:10.3389/fcimb.2021.822562

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W 2003 roku, będąc studentką III roku studiów (Politechnika Wrocławska, kierunek: Biotechnologia) podjęłam się realizacji Pracy Badawczej w **Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk (IITD, PAN)** pod opieką naukową dr hab. Adama Opolskiego a później Prof. dr hab. Joanny Wietrzyk. W ramach podjętych prac prowadziłam badania nad możliwością jednoczesnego stosowania konwencjonalnych leków cytostatycznych oraz bakteriofagów u pacjentów onkologicznych. Realizacja tych badań przełożyła się na opublikowanie pracy Szczauńska-Nowak i wsp. (2009), której jestem współautorką. Jako, że chętnie angażowałam się w dodatkowe projekty i wspomagałam zespół naukowy Prof. Wietrzyk również w badaniach nie stanowiących mojego tematu wiodącego, stąd efektem prac tego okresu jest również publikacja Wietrzyk i wsp. (2008) dotycząca wpływu różnych form witaminy D na ekspresję integryn na powierzchni komórek nowotworowych. Badania podjęte w ramach Pracy Badawczej kontynuowałam w **Laboratorium Bakteriofagowym IITD PAN** gdzie realizowałam pracę magisterską pod opieką naukową Prof. Krystyny Dąbrowskiej. Tematem pracy było „Badanie przeciwnowotworowej aktywności nowych preparatów bakteriofagowych” a wyniki prowadzonych badań zostały opublikowane w artykule Dąbrowska i wsp. (2009). Praca z bakteriofagami wydała mi się szczególnie interesująca, stąd swoją dalszą ścieżkę naukową postanowiłam związać właśnie z tymi wirusami. W 2006 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w tej samej jednostce pod opieką naukową Prof. dr hab. med. Andrzeja Górskiego. Oprócz wspomnianych prac, w tym okresie ukazały się również dwa oryginalne artykuły naukowe (Międzybrodzki i wsp., 2008; Dąbrowska i wsp., 2010), których jestem współautorką oraz dwa artykuły przeglądowe (Kurzępa i wsp., 2009a; Kurzępa i wsp. 2009b), których jestem pierwszą autorką oraz autorką korespondencyjną. Warto podkreślić, że jako studentka studiów doktoranckich byłam również kierownikiem projektu badawczego finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (KBN) (MNiSW N N402 2855 35) dotyczącego oddziaływań bakteriofagów z komórkami układu odpornościowego człowieka. W 2008 roku, mój potencjał jako młodego naukowca został dostrzeżony i

doceniony poprzez przyznanie mi nagrody Perspektywy-Elsevier Young Researcher Award 2008. Podczas realizacji pracy doktorskiej zajmowałam się badaniem wpływu fagów na migrację oraz zabijanie wewnątrzkomórkowe bakterii przez ludzkie fagocyty. Podjęte prace wpisują się w niezwykle istotny obszar badawczy dotyczący wpływu terapii fagowej na komórki organizmu ludzkiego, w szczególności wpływu na jego naturalne mechanizmy obronne. Warto podkreślić, że pacjenci podejmujący leczenie w ramach terapii fagowej często posiadają upośledzone czynności układu odpornościowego, stąd podjęcie takich prac ma istotne znaczenie kliniczne. W ramach pracy doktorskiej kontynuowałam również badania dotyczące oddziaływań fagów z komórkami nowotworowymi, określając wpływ wirusów bakteryjnych na potencjał migracyjny komórek nowotworowych linii ludzkiej białaczki H1-60. Wyniki badań zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej zostały opublikowane w dwóch artykułach naukowych Kurzępa-Skaradzińska (2013a) i Kurzępa-Skaradzińska (2013b).

Warto podkreślić, że Laboratorium Bakteriofagowe IITD PAN, w którym rozpoczynałam badania nad wirusami bakteryjnymi, jest jednostką posiadającą ogromne tradycje w pracy z bakteriofagami. To właśnie przy Instytucie został założony pierwszy w Europie i drugi na świecie Ośrodek Terapii Fagowej, który dysponuje opublikowanymi danymi terapeutycznymi pochodzącymi od największej liczby pacjentów w skali globalnej (obecnie ponad 500) (Żaczek i wsp., 2022). Naukowcy wchodzący w skład zespołu są klasyfikowani wśród autorów z największym dorobkiem publikacyjnym w skali światowej w zakresie terapii fagowej z Prof. Andrzejem Górskim na czele rankingu (Maimaiti i wsp., 2023). Swoje doświadczenie w pracy z bakteriofagami zdobywałam więc w jednostce z niezwykle dużym dorobkiem ucząc się od badaczy zarówno z wielką wiedzą teoretyczną jak i umiejętnościami praktycznymi w zakresie badań nad wirusami bakteryjnymi.

Po obronie pracy doktorskiej zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w **Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu**. W związku z tym, że profil badawczy jednostki jest ukierunkowany na poprawę jakości produktów spożywczych moja koncepcja badawcza skupiła się również na zastosowaniu fagów w bezpieczeństwie żywności, w szczególności w odniesieniu do zwierząt hodowlanych. Wkrótce po rozpoczęciu pracy udało mi się pozyskać projekt w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, w którym zostałam kierownikiem zadania realizowanego przez Uniwersytet

Przyrodniczy we Wrocławiu. Celem projektu było opracowanie preparatu fagowego przeciwko antybiotykoopornym bakteriom do stosowania w hodowli zwierząt. Był to projekt realizowany we współpracy ze środowiskiem przemysłowym, a jego głównym beneficjentem była firma Skotan S.A.. Wyniki projektu zostały opublikowane w czterech artykułach naukowych (Choińska-Pulit i wsp., 2015; Skaradzińska i wsp. 2018; Śliwka i wsp., 2019; Śliwka i wsp. 2023) wchodzących w skład cyklu. Po zakończeniu projektu odbyłam staż naukowy w **Institut für Tier-und Umwelthygiene na Freie Universität w Berlinie** gdzie pod opieką naukową Prof. Uwe Röslera zajmowałam się badaniem fagów przeciwko ESBL/AmpC *E. coli* izolowanym ze środowiska trzody chlewnej oraz ferm indyków. Pobyt ten zaowocował powstaniem pracy Skaradzińska i wsp. (2017) a współpraca z zespołem z Niemiec przyczyniła się do powstania kolejnej publikacji Skaradzińska i wsp. (2020). Zarówno realizowany projekt jak i odbyty staż pozwoliły na skupienie się na aspektach technicznych przygotowywania preparatów fagowych, co z kolei przyczyniło się do powstania cyklu publikacji przedłożonych ocenie w niniejszym wniosku habilitacyjnym.

Dodatkowym osiągnięciem uzyskanym podczas pracy na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu są również rezultaty badań dotyczących izolacji nowych fagów o potencjale aplikacyjnym w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt. W ramach prac przedstawionych w publikacji Kuźmińska-Bajor i wsp. (2021) wyizolowanych i scharakteryzowanych zostało pięć nowych bakteriofagów zdolnych do eliminacji różnych serowarów *Salmonella*, bakterii stanowiącej główną przyczynę infekcji pokarmowych u ludzi. Prace te zostały przeprowadzone w ramach projektu „Preparaty bakteriofagowe dla drobiu przeciwko *Salmonella*, *Campylobacter* i ptasiej patogennej *Escherichia coli* (APEC)” (NCN LIDER/378/L-6/14/NCBR/2015), którego byłam wykonawcą. Warto również dodać, że bakteriofagom specyficznym do patogenów pokarmowych została poświęcona praca przeglądowa Hyla i wsp. (2022), w której jestem autorką korespondencyjną. Z kolei w publikacji Weber-Dąbrowska i wsp. (2023) przedstawiono szczegółową charakterystykę bakteriofagów specyficznych do *Klebsiella pneumoniae* oraz *Klebsiella oxytoca*. Bakterie rodzaju *Klebsiella* spp. charakteryzują się wysoką zjadliwością i wykazują ogromny potencjał chorobotwórczy względem ludzi i zwierząt. Szczególnym problemem jest szerzące się w obrębie poszczególnych szczepów *Klebsiella* spp. zjawisko antybiotykooporności. Bakterie tego rodzaju zostały włączone przez Amerykańskie Towarzystwo Chorób

Zakaźnych do grupy ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.), patogenów o szczególnych zdolnościach do wykształcania oporności względem dostępnych antybiotyków. Badania przedstawione w niniejszej pracy zostały wykonane we współpracy z zespołami badawczymi kilku jednostek IITD PAN we Wrocławiu oraz Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Warto również dodać, że praca przeglądowa Śliwka i wsp. (2022), w której w obszerny sposób omawiany jest potencjał fagów w eliminacji bakterii wewnątrzkomórkowych, również wpisuje się w temat potencjalnego wykorzystania tych wirusów celem zwalczania bakterii stanowiących szczególne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. W obrębie grupy bakterii wewnątrzkomórkowych znajdują się patogeny, które ze względu na swój cykl rozwojowy są w stanie skutecznie unikać odpowiedzi zarówno ze strony układu odpornościowego gospodarza jak i przeciwbakteryjnych leków. Tym samym często ta grupa bakterii może powodować zakażenia trudne w leczeniu bądź infekcje przewlekłe. Wykorzystanie fagów przeciwko tej grupie patogenów mogłoby potencjalnie stanowić istotną alternatywę dla konwencjonalnych leków.

Opracowanie strategii eliminacji drobnoustrojów patogennych za pomocą czynników fizycznych stanowi odrębny temat badawczy i **kolejne osiągnięcie**. Jak wskazują doświadczenia ostatnich lat, kiedy to świat zmagał się z pandemią wirusa SARS-CoV-2 i ostatnich tygodni kiedy media donoszą o kolejnych zakażeniach i zgonach powodowanych przez *Legionella* spp., wdrażanie systemów ograniczających rozprzestrzenianie się chorobotwórczych mikroorganizmów jest priorytetem zdrowia publicznego. Badania prowadzone są we współpracy z zespołami badawczymi Instytutu Elektrotechniki Sieci Badawczej Łukasiewicz, Katedry Podstaw Elektrotechniki i Elektrotechnologii Wydziału Elektrycznego Politechniki Wrocławskiej oraz Katedry Technologii Inżynierskich i Zarządzania Budownictwem Uniwersytetu w Charlotte (USA). W ramach współpracy odpowiedzialna jestem za projektowanie części doświadczeń związanych z wykorzystaniem drobnoustrojów, w tym bakteriofagów, które stanowią wirusowy model badawczy. Rezultaty przeprowadzonych prac zostały opublikowane w pracy Mazurek i wsp. (2023). Warto również dodać, że uzyskane wyniki okazały się na tyle interesujące, że złożony został wniosek projektowy w konkursie Narodowego Centrum Nauki (NCN) OPUS 25.

Moje dalsze plany naukowe obejmują kontynuowanie rozpoczętych prac, w szczególności badań dotyczących optymalizacji technik pracy z bakteriofagami, izolacji i charakterystyki nowych fagów o potencjale terapeutycznym oraz rozwoju strategii eliminacji patogenów. Tematem, na którym chciałabym się jednak skupić jest badanie synergizmu między fagami a biosurfaktantami w eliminacji bakterii chorobotwórczych. Synergizm bakteriofagów z antybiotykami był wykazywany wielokrotnie, jednakże, wszystko wskazuje na to, że potencjał stosowania tych związków jest w chwili obecnej coraz bardziej ograniczony. Ilość nowych leków wprowadzanych na rynek zmniejsza się a firmy farmaceutyczne niechętnie podejmują się badań nad poszukiwaniem nowych antybiotyków ze względu na wysokie koszty i duże ryzyko niepowodzenia.

Biosurfaktanty są to związki pochodzenia mikrobiologicznego wykazujące niską toksyczność, wysoką biodegradowalność i dużą wszechstronność działania (Nikolova i Gutierrez, 2021). Zarówno bakteriofagi, jak i biosurfaktanty łączy wysoka skuteczność działania, specyficzność, niska toksyczność, łatwość izolacji i niskie koszty produkcji. Hipoteza badawcza zakłada, że połączenie środków przeciwdrobnoustrojowych o różnych mechanizmach działania pozwoli na wyznaczenie zupełnie nowych perspektyw zwalczania patogenów bakteryjnych, co jest istotne w szczególności w przypadku patogenów lekoopornych.

Obszarem badawczym, na którym chciałabym się szczególnie skupić jest zastosowanie mieszanin fagów i biosurfaktantów w zwalczaniu patogenów skórnych. Jak wskazują dane Ośrodka Terapii Fagowej we Wrocławiu zakażenia skórne stanowią dominującą grupę infekcji leczonych w latach 2006-2021 a *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* są najczęściej izolowanymi oportunistycznymi patogenami od pacjentów (Żaczek i wsp., 2022). Jako, że opracowywanie nośników dla wirusów bakteryjnych stanowi bliską mi tematykę badawczą, dodatkowym celem prac będzie opracowanie nośnika dla mieszanin fagów oraz biosurfaktantów w formie opatrunku za zakażone rany. Przeprowadzone dotychczas prace wskazują na możliwość zastosowania w tym celu celulozy produkowanej przez bakterie *Komagataeibacter sucrofermentans*. Proces opracowania opatrunków hydrożelowych z wykorzystaniem bakteryjnej celulozy wymaga niewątpliwie optymalizacji, jest to jednak w mojej ocenie niezwykle interesujący temat badawczy.

Wstępne wyniki badań wskazują, że istnieje zjawisko synergizmu między fagami i biosurfaktantami a efekt bójczy jest znacząco silniejszy przy zastosowaniu

mieszaniny tych czynników w porównaniu do ich osobnego zastosowania. Mimo, iż nie jesteśmy obecnie w stanie określić mechanizmów tego zjawiska, otwiera to niewątpliwie nowe możliwości zastosowania tych czynników w strategiach przeciwbakteryjnych.

Uzyskane dotychczas wyniki dotyczące tematyki synergizmu bakteriofagów i biosurfaktantów zostały przedstawione w formie plakatu na konferencji Viruses of Microbes 2023 w Tbilisi, w Gruzji a ponadto zostaną zaprezentowane także w formie plakatu na II Sympozjum Bakteriofagowym, które odbędzie się w dniach 07-09.09.2023 w Gdańsku. Badania wstępne w tej tematyce zostały również objęte finansowaniem projektu wewnętrznego Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, który jest obecnie realizowany. W oparciu o wyniki uzyskane w ramach tych badań planowane jest złożenie wniosku projektowego w konkursie NCN typu OPUS.

LITERATURA

1. Choińska-Pulit A., Mituła P., Śliwka P., Łaba W., Skaradzińska A. (2015) Bacteriophage encapsulation: trends and potential applications. *Trends Food Sci Technol.* 5:327-349. doi:10.1016/j.tifs.2015.07.001
2. Dąbrowska K., Skaradziński G., Jończyk P., Kurzępa A., Wietrzyk J., Owczarek B., Żaczek M., Światała-Jeleń K., Boratyński J., Poźniak G., Maciejewska M., Górski A. (2009) The effect of bacteriophages T4 and HAP1 on in vitro melanoma migration. *BMC Microbiol.* 9:13. doi:10.1186/1471-2180-9-13
3. Dąbrowska K., Skaradziński G., Kurzępa A., Owczarek B., Żaczek M., Weber-Dąbrowska B., Wietrzyk J., Maciejewska M., Budynek P., Górski A. (2010) The effects of staphylococcal bacteriophage lysates on cancer cells in vitro. *Clin Exp Med.* 10:81-85. doi:10.1007/s10238-009-0066-9
4. Hyla K., Dusza I., Skaradzińska A. (2022) Recent advances in the application of bacteriophages against common foodborne pathogens. *Antibiotics* 11:1536. doi:10.3390/antibiotics11111536
5. Kurzępa A., Dąbrowska K., Światała – Jeleń K., Górski A. (2009a) Molecular modification of bacteriophage T4 proteins and its potential application. *Folia Microbiol.* 54:5-15. doi:10.1007/s12223-009-0002-0
6. Kurzępa A., Dąbrowska K., Skaradziński G., Górski A. (2009b) Bacteriophage interactions with phagocytes and their potential significance in experimental therapy. *Clin Exp Med.* 9:93. doi:10.1007/s10238-008-0027-8
7. Kurzępa-Skaradzińska A., Skaradziński G., Weber-Dąbrowska B., Żaczek M., Maj T., Sławek A., Światałska M., Maciejewska M., Wietrzyk J., Rymowicz W., Górski A. (2013a) Influence of bacteriophage preparations on migration of human leukemia cells. *Anticancer Res.* 33:1569-1574
8. Kurzępa-Skaradzińska A., Łusiak-Szelachowska M., Skaradziński G., Jończyk-Matysiak E., Weber-Dąbrowska B., Żaczek M., Maj T., Sławek A., Rymowicz W., Kłak M., Międzybrodzki R., Górski A. (2013b) Influence of bacteriophage preparations on intracellular killing of bacteria by human phagocytes in vitro. *Viral Immunol.* 26:150-162. doi:10.1089/vim.2012.0071
9. Kuźmińska-Bajor M., Śliwka P., Ugorski M., Korzeniowski P., Skaradzińska A., Kuczkowski M., Narajczyk M., Wieliczko A., Kolenda R. (2021) Genomic and functional characterization of five novel *Salmonella*-targeting bacteriophages. *Virol J.* 18:183. doi:10.1186/s12985-021-01655-4

10. Maimaiti Z., Li Z., Xu C., Chen J., Chai W. (2023) Global trends and hotspots of phage therapy for bacterial infection: A bibliometric visualized analysis from 2001 to 2021. *Front Microbiol.* 13:1067803. doi:10.3389/fmicb.2022.1067803
11. Mazurek B., Kogut K., Wieczorek K., Skaradzińska A., Skaradziński G., Ochocka M., Noras M. (2023) Virus elimination using high-voltage pulses in aqueous solutions. *IEEE Trans Plasma Sci.* 51:762-770. doi:10.1109/TPS.2023.3244899
12. Międzybrodzki R., Świła-Jeleń K., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Przerwa A., Łusiak-Szelachowska M., Dąbrowska K., Kurzępa A., Boratyński J., Syper D., Poźniak G., Ługowski C., Górski A. (2008) Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Virus Res.* 131:233-242. doi:10.1016/j.virusres.2007.09.013
13. Nikolova C., Gutierrez T. (2021) Biosurfactants and their applications in the oil and gas industry: current state of knowledge and future perspectives. *Front Bioeng Biotechnol.* 9:626639 doi:10.3389/fbioe.2021.626639
14. Skaradzińska A., Śliwka P., Kuźmińska-Bajor M., Skaradziński G., Rząsa A., Friese A., Roschanski N., Murugaiyan J., Roesler U. (2017) The efficacy of isolated bacteriophages from pig farms against ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig and turkey farms. *Front Microbiol.* 8:530. doi:10.3389/fmicb.2017.00530
15. Skaradzińska A., Skaradziński G., Choińska-Pulit A., Śliwka P., Łaba W., Mituła P., Żaczek M., Weber-Dąbrowska B. (2018) Potential application of lyophilization in commercial use of bacteriophage preparations in veterinary medicine. *Slov Vet Res.* 55:73-80. doi:10.26873/SVR-396-2017
16. Skaradzińska A., Ochocka M., Śliwka P., Kuźmińska-Bajor M., Skaradziński G., Friese A., Roschanski N., Murugaiyan M., Roesler U. (2020) Bacteriophage amplification – a comparison of selected methods. *J Virol Methods.* 282:113856. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113856
17. Śliwka P., Mituła P., Mituła A., Skaradziński G., Choińska-Pulit A., Niezgoda N., Weber-Dąbrowska B., Żaczek M., Skaradzińska A. (2019) Encapsulation of bacteriophage T4 in mannitol-alginate dry microspheres and survival in simulated gastrointestinal conditions. *LWT Food Sci Technol.* 99:238-243. doi:10.1016/j.lwt.2018.09.043
18. Śliwka P., Ochocka M., Skaradzińska A. (2022) Applications of bacteriophages against intracellular bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 48:222-239. doi:10.1080/1040841X.2021.1960481
19. Śliwka P., Weber-Dąbrowska B., Żaczek M., Kuźmińska-Bajor M., Dusza I., Skaradzińska A. (2023) Characterization and comparative genomic analysis of three virulent *E. coli* bacteriophages with the potential to reduce antibiotic-resistant bacteria in the environment. *Int J Mol Sci.* 24:5696. doi:10.3390/ijms24065696
20. Szczaurska – Nowak K., Dąbrowska K., Celka M., Kurzępa A., Nevozhay D., Wietrzyk J., Świła – Jeleń K., Syper D., Poźniak G., Opolski A., Górski A., Radzikowski C. (2009) Antitumor effect of combined treatment of mice with cytostatic agents and bacteriophage (BF T4). *Anticancer Res.* 29:2361-2370
21. Weber-Dąbrowska B., Żaczek M., Łobocka M., Łusiak-Szelachowska M., Owczarek B., Orwat F., Łodej N., Skaradzińska A., Łaczmański Ł., Martynowski D., Kaszowska M., Górski A. (2023) Characteristics of environmental *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* bacteriophages and their therapeutic applications. *Pharmaceutics* 15:434. doi:10.3390/pharmaceutics15020434
22. Wietrzyk J., Filip B., Milczarek M., Kłopotowska D., Maciejewska M., Dąbrowska K., Kurzępa A., Dzimira S., Madej J., Kutner A. (2008) The influence of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 1,24-dihydroxyvitamin D3 on vβ3 integrin expression in cancer cell lines. *Anticancer Res.* 20:941-952
23. Żaczek M., Górski A., Weber-Dąbrowska B., Letkiewicz S., Fortuna W., Rogóż P., Pasternak E., Międzybrodzki R. (2022) A thorough synthesis of phage therapy unit activity in Poland-its history, milestones and international recognition. *Viruses* 14:1170. doi:10.3390/v14061170.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Zajęcia prowadzone w języku polskim

rodzaj kursu	nazwa kursu	stopień studiów, kierunek
wykład	Wirusologia*	II, Biotechnologia
wykład	Biochemia*	I, Zarządzanie Jakością i Analiza Żywności; I, Technologia i Organizacja Gastronomii
ćwiczenia laboratoryjne	Biochemia*	I, Zarządzanie Jakością i Analiza Żywności; I, Technologia i Organizacja Gastronomii
ćwiczenia laboratoryjne	Biochemia	I, Biotechnologia; I, Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka I, Żywnienie Człowieka i Dietetyka
ćwiczenia laboratoryjne	Biotechnologia drobnoustrojów	II, Biotechnologia
ćwiczenia laboratoryjne	Mikrobiologia	I, Biotechnologia; I, Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka I, Żywnienie Człowieka i Dietetyka I, Zarządzanie Jakością i Analiza Żywności; I, Technologia i Organizacja Gastronomii
ćwiczenia laboratoryjne	Enzymologia	I, Biotechnologia
ćwiczenia laboratoryjne	Biologia molekularna	I, Biotechnologia
wykład fakultatywny	Szybkie metody mikrobiologicznej analizy żywności*	I, Biotechnologia; I, Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka I, Zarządzanie Jakością i Analiza Żywności;

*koordynator przedmiotu

Zajęcia prowadzone w języku angielskim dla studentów wymiany Erasmus+:

rodzaj kursu	nazwa kursu
wykład	Virology
wykład	Biochemistry

Inne osiągnięcia dydaktyczne:

- Koordynator merytoryczny dla kierunku Biotechnologia w projekcie „Kierunki zamawiane Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu – biotechnologia i ochrona środowiska” współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007-2013, poddziałanie 4.1.2. w wymiarze ¼ etatu od dnia 15.02.2013 do 28.02.2016
- Opieka merytoryczna nad projektami badawczymi dwóch studentów wymiany Erasmus+ (5 miesięcy (Hiszpania); 8 miesięcy (Rumunia))
- Opracowanie programu wykładów (w tym opracowanie sylabusów) dla przedmiotów: Wirusologia (II, Biotechnologia), Szybkie metody mikrobiologicznej analizy żywności (I, Biotechnologia; I, Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka; I, Zarządzanie Jakością i Analiza Żywności) oraz programu kursów Biochemisty i Virology dla studentów wymiany Erasmus+
- Opieka nad projektami badawczymi 5 studentów koła naukowego
- Promotor 21 prac magisterskich oraz 19 prac inżynierskich
- Recenzent 7 prac magisterskich oraz 15 prac inżynierskich
- Opiekun roku kierunku Biotechnologia w latach 2013-2016

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Nagrody i wyróżnienia

- Laureatka Nagrody Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za rok 2013: Nagroda zespołowa II stopnia za cykl publikacji pt. „Białka strukturalne i enzymatyczne jako czynniki biologicznych interakcji z komórkami organizmów wyższego rzędu”

- Laureatka Nagrody Elsevier Perspektywy „Young Researcher Award 2008”
- Nagroda National Geographic dla zespołu naukowego Laboratorium Bakteriofagowego IITD PAN: Travelery 2007 - Naukowe Odkrycie Roku - "Unikalna eksperymentalna terapia wirusami bakteryjnymi (bakteriofagami)”

Promotor pomocniczy doktoratu

- Promotor pomocniczy doktoratu „Opracowanie preparatu bakteriofagowego o potencjale aplikacyjnym w hodowli zwierząt” (mgr Paulina Śliwka; obrona: 2021)

Członkostwo w uczelnianych zespołach badawczych

- Członkostwo w Wiodącym Zespole Badawczym (UPWr): Biotechnologia dla życia i przemysłu Biotech@Life (od 2019 roku)

Udział w organach kolegialnych Uczelni

- Członkostwo w komisji doktorskiej, w której pełniłam funkcję sekretarza
- Członkostwo w dwóch Komisjach Rekrutacyjnych na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności 2011/2012 i 2012/2013

Inne prace organizacyjne w ramach Uczelni

- W okresie 2011-2020 byłam odpowiedzialna za planowanie oraz rozliczanie godzin dydaktycznych w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Udział w szkoleniach

- 21.05.2018 – szkolenie organizowane przez wydawnictwo Elsevier na temat baz Scopus i Mendeley
- 06.04.2022 – szkolenie z zakresu Open Access w kontekście wdrażania polityki otwartego dostępu na UPWr

- 26.09.2019 – szkolenie prowadzone przez ekspertów z NCN z zakresu aplikowania i rozliczania projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki

Inne:

W momencie mojego zatrudnienia w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności w roku 2011, jednostka ta nie miała żadnych tradycji ani doświadczenia w badaniach nad bakteriofagami. Rozpoczynając pracę musiałam opracować koncepcję badawczą opartą na bakteriofagach, pozyskać środki finansowe na prowadzenie własnych badań, dostosować dostępną w Katedrze aparaturę do prowadzonych prac oraz nawiązać współpracy umożliwiające mi podjęcie określonej tematyki badawczej. Badania rozpoczynałam od izolacji pierwszych bakteriofagów oraz bakterii, jako że dotychczasowa tematyka zespołu skupiała się głównie wokół przemysłowego wykorzystania drożdży. Obecnie zespół prowadzący badania nad wirusami bakteryjnymi liczy trzy osoby zatrudnione na stanowisku adiunkta (włącznie ze mną), dwóch doktorantów, pięciu magistrantów oraz dwóch studentów realizujących badania w ramach koła naukowego. Ponadto mogę stwierdzić, że dzięki mojej pracy, badania nad biologią bakteriofagów i ich potencjalnym zastosowaniem stały się istotnym tematem badawczym Katedry.

Aneta Skaradzińska

.....
(podpis wnioskodawcy)