



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
W POZNANIU**

KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

Poznań, 11.10.2023

Prof. UPP dr hab. inż. Anna Sip
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra inż. Pawła Korzeniowskiego
pt. „Biofilmy w produkcji żywności i rola bakteriofagów w ich eradykacji”
wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
pod kierunkiem prof. dr hab. Waldemara Rymowicza

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (UPWr), podjętą w dniu 25 lipca 2023 r. w związku z postępowaniem wszczętym celem nadania panu mgr inż. Pawłowi Korzeniowskiemu stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Recenzja uwzględnia wymagania określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2023, poz. 1668 ze zm.).

Dobór i znaczenie tematu

Dobrze opracowane i prawidłowo stosowane procedury mycia i dezynfekcji pozwalają na skuteczne usuwanie zanieczyszczeń powodowanych przez formy planktoniczne drobnoustrojów. Niestety wiele z nich nie daje pożądaných efektów w stosunku do drobnoustrojów tworzących biofilmy. Dlatego też biofilmy, zwłaszcza złożone z bakterii chorobotwórczych, stanowią duży problemem w wielu gałęziach gospodarki. Szacuje się, że mogą być one źródłem nawet ponad 70% zakażeń zwierząt hodowlanych oraz żywności. Rosnąca oporność biofilmów na działanie czynników fizykochemicznych, w tym dezynfektantów i antybiotyków, dodatkowo potęguje związane z nimi zagrożenia i problemy. Dlatego też w laboratoriach na całym świecie prowadzone są badania mające na celu, z jednej strony poznanie czynników sprzyjających tworzeniu się biofilmów i poprzez to ograniczenie ryzyka ich rozwoju, z drugiej natomiast zmierzające do opracowania skutecznych metod ich eliminacji. W tym kontekście z ogromną nadzieją patrzy się na możliwość wykorzystania biocydów (np. kwasów organicznych, bakteriocyn, enzymów), fitozwiązków (np. polifenoli roślinnych), olejków eterycznych, technologii niebieskiego światła oraz bakteriofagów. Ocena potencjału/przydatności tych ostatnich, a dokładniej bakteriofagów z kolekcji UPWr specyficznych w stosunku do *Salmonella* i *E. coli*, jako dezynfektantów, konserwantów żywności oraz dodatków zootechnicznych do paszy i wody, stała się przedmiotem badań dysertacyjnych.

Ocena strony formalnej pracy i uwagi ogólne

Praca doktorska pana mgr inż. Pawła Korzeniowskiego jest złożona z 125 stron maszynopisu i przygotowana w formie manuskryptu. Przedstawiono w niej interesujący materiał wynikowy, który stanowi dobrą bazę do dalszych, bardziej pogłębionych badań. W pracy zamieszczono 10 tabel, 34 wykresy oraz 5 rysunków, nazwanych obrazami. Struktura rozprawy jest typowa dla prac o charakterze doświadczalnym. Rozprawa jest podzielona na 7 rozdziałów, w których przedstawiono przegląd literatury (wstęp, 30 str.), cele i założenia pracy, materiały i metody badawcze (22 str.), omówienie wyników badań (27 str.), dyskusję (10 str.), wnioski oraz spis cytowanej literatury (26 str.). Oprócz tego w rozprawie zamieszczono streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Szkoda, że nie znalazły się w nim również skróty własne wprowadzone na potrzeby pracy (np. S1-5, E1-4). W dysertacji zacytowano 256 pozycji literaturowych, w większości z ostatniej dekady. Ich spis jest przygotowany niestarannie. Odnośniki literaturowe są umieszczone prawidłowo, natomiast odsyłacze znajdujące się w treści pracy, nie zawsze od razu kierują do rozdziałów źródłowych (np. w rozdziale 3.2.9.3 powołano się na metodykę zamieszczoną w rozdziale 3.2.9.2, z którego jest przekierowanie do rozdziału 3.2.2). Tytuł pracy jest bardzo ogólny i przez to trochę mylący. Sugeruje bowiem bezpośredni związek przedmiotowych badań z produkcją żywności; większy udział w pracy badań w warunkach przemysłowych lub zbliżonych do nich. Geneza pracy jest dobrze wyjaśniona, choć nie znajduje pełnego odzwierciedlenia w podanych „dwóch pomniejszych cechach częściowych”, w których zabrakło np. informacji o wykorzystaniu w badaniach szczepów różniących się opornością na działanie antybiotyków (na erytromycynę). Kolejność prezentacji wyników badań nie jest do końca logiczna (tworzenie biofilmu - oporność bakteriofagów na trawienie - badania modelowe nad wykorzystaniem bakteriofagów do usuwania biofilmów z powierzchni abiotycznych itd.). W części metodycznej pracy zduplikowano metodykę większości badań modelowych dotyczących biofilmów *Salmonella* i *E. coli* (rozdz. 3.2.6=3.2.12, 3.2.7=3.2.13, 3.2.8=3.2.14, 3.2.9=3.2.15). Zauważam też, że kilka podrozdziałów metodycznych ma identyczne tytuły („Oznaczanie wielkości biofilmu” 3.2.7.2=3.2.8.2=3.2.13.2=3.2.14.2). Co więcej, podrozdziały złożone z więcej niż trzech cyfr nie zostały ujęte w spisie. Tytuły rozdziałów, przede wszystkim metodycznych i wynikowych, niepotrzebnie powielają te same dane. W sposobie ich tworzenia brakuje też konsekwencji (spójnej nomenklatury). Poza tym tytuły rozdziałów od razu sugerują efekt badań, tj. degradację, eliminację lub redukcję biofilmów, czy eradykację pałeczek, zamiast odnosić się do ich przedmiotu. Mam też wrażenie, że ww. pojęcia są używane w pracy zamiennie. Z powyższych względów układ pracy jest mało przejrzysty. Cała praca jest słabo przygotowana od strony graficznej i edytorskiej. Z uwagi na jednolitą kolorystkę (siedem prawie identycznych odcieni koloru niebieskiego), wykresy są mało czytelne - nie dają możliwości analizy zamieszczonych na nich danych. W pracy brakuje ponadto spójności w zakresie sposobu podawania jednostek (np. 2 min. vs. 120 s, 72h vs. 3 dni) oraz zapisu danych liczbowych (np. 0,2 vs. 0.2). Poza tym używanie określeń „dojrzały biofilm”, „niszczenie struktury biofilmu”, „wielkość biofilmu”, czy nawet „redukcja masy biofilmu”, w odniesieniu do wyników badań własnych, według mnie jest nieuprawnione, ponieważ nie prowadzono badań w tych zakresach (nie zajmowano się „wizualizacją biofilmów” i badaniem ich struktury). Zauważam ponadto, że w pracy nie zamieszczono wyników wykonanych analiz statystycznych, tylko pobieżnie je omówiono.

Podsumowując stwierdzam, że mimo wyraźnych niedociągnięć rozprawa mgr inż. Pawła Korzeniowskiego pod względem formalnym spełnia wymagania stawiane dysertacjom na stopień naukowy doktora, tj. ma charakter eksperymentalny i zawiera komplet wymaganych rozdziałów. Prezentowane w niej dane mogły być jednak lepiej pogrupowane i uporządkowane, a także opisane z większą starannością i wnikliwością.

Ocena merytoryczna pracy

Recenzowana praca autorstwa mgr inż. Pawła Korzeniowskiego koncentruje się na badaniu zdolności bakteriofagów litycznych do działania na bakterie *Salmonella* Enteritidis i *E. coli* (APEC) kolonizujące powierzchnie abiotyczne i biotyczne, w tym powierzchnie produktów roślinnych i zwierzęcych. Dodatkowo pokazuje jaki wpływ na infekcje kurcząt rzeźnych bakteriami *Salmonella* ma dodatek bakteriofagów do wody, podawanej im za pośrednictwem zanieczyszczonych biofilmami poidła dzwonowatych.

Pracę rozpoczyna 30 stronicowy wstęp literaturowy, który dobrze wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy. Wstęp literaturowy składa się z aż dwudziestu podrozdziałów, dotyczących de facto czterech głównych zagadnień: i) bakterii *Salmonella*, ii) *E. coli*, iii) bakteriofagów i iv) biofilmów. W rozdziale pt. „Wstęp” najpierw krótko omówiono chorobotwórczość bakterii *Salmonella* i *E. coli*. Pokazano ich wpływ na organizm człowieka i drobiu, akcentując problemy związane z nabywaniem przez nie oporności, a nie jak często podano „odporności”, na antybiotyki i inne chemioterapeutyki. Informacje te w połączeniu z prezentowanym później danymi, dotyczącymi zdolności charakteryzowanych bakterii do tworzenia biofilmów, podkreśliły znaczenie badań dysertacyjnych. We wstępie literaturowym omówiono też budowę i cykl replikacyjny bakteriofagów oraz kierunki praktycznego wykorzystania ich aktywności. Zwrócono uwagę na różne możliwości aplikacji bakteriofagów oraz poruszono kwestie związane z bezpieczeństwem ich stosowania. Ponadto dokładnie opisano proces tworzenia biofilmów oraz ich źródła. Zwieńczeniem przeglądu literaturowego jest rozdział, w którym pokazano wyniki prac innych badaczy związanych z wykorzystaniem bakteriofagów do zwalczania biofilmów. W rozdziale tym wypunktowano też czynniki determinujące skuteczność działania bakteriofagów przeciwko biofilmom bakteryjnym, takie jak: struktura macierzy, skład, dojrzałość i grubość biofilmu. Szkoda, że wymienione czynniki nie zostały uwzględnione w badaniach dysertacyjnych. W ich planowaniu pomogłoby również zebranie wiedzy na temat innych metod walki z biofilmami oraz oceny ich skuteczności. Zauważam bowiem, że w pracy do detekcji biofilmów wykorzystano tylko podstawowe techniki mikrobiologiczne (barwienie, posiewy). Wyniki tak przeprowadzonych badań pozwoliły jedynie na zarejestrowanie efektu działania bakteriofagów (ich wpływu na „wielkość” biofilmu i/lub liczbę tworzących go zdolnych do wzrostu komórek). Dobrym rozwiązaniem byłoby uzupełnienie badań o analizy cytometryczne (określenie występowania form przejściowych komórek w biofilmach potraktowanych bakteriofagami oraz ich zdolności do regeneracji) oraz mikroskopię konfokalną (przeprowadzenie analizy struktury przestrzennej biofilmów). Bez takich analiz oraz uwzględnienia dodatkowych zmiennych, np. czasu, temperatury tworzenia biofilmu, jego wielkości, czy składu, oceniana praca wydaje się jednowymiarowa i przez to trochę powierzchowna, a wnioski mało uniwersalne. Poza tym nie zawsze, zwłaszcza w przypadku badań, których przedmiotem była sałata, mięso drobiowe oraz poidła jestem przekonana, że rzeczywiście analizowano biofilmy (ten wątek poruszę w dalszej części recenzji).

W pracy wykorzystano skromny wachlarz metod analitycznych. Metody te zostały dokładnie opisane, aczkolwiek wielokrotnie, na co zwróciłam uwagę już wcześniej. W rozdziale „Materiały i metody” dostrzegam też pewne niedociągnięcia i nieścisłości. Brakuje w nim np. informacji o rasie kurcząt wykorzystanych w badaniach, miejscu prowadzenia doświadczeń z ich udziałem oraz opisu sposobu przygotowania próbek ich narządów do analiz. Z treści pracy nie wynika też jaki rodzaj sałaty był podmiotem badań. Nieznane jest też pochodzenie piersi kurczaka oraz nie wiadomo jakie dokładnie ich fragmenty (o wymiarach 1x1x1cm) analizowano. Percepcję treści pracy bardzo ułatwiłoby zamieszczenie schematu stosowanych poidła oraz zaznaczenie miejsc poboru wymazów. Z uwagi na to, że poidła były napełnione wodą lub pożywką, ciekawi mnie w jaki sposób zbierano z nich wymazy oraz

dłaczego wymazówki wytrząsano aż 30 minut. Czy możliwe było dokładne pobranie wymazów z powierzchni zaledwie 1cm² oraz czy takie wymazy były reprezentatywne (czy powierzchnie poideł były równomiernie pokryte biofilmem)? Czy rzeczywiście z poideł zbierano biofilm, a jeżeli tak to czy cały? Z doświadczenia wiem, że biofimy są trudne do usunięcia w sposób mechaniczny. Ich oderwanie wymaga użycia dobrze dobranych detergentów lub zastosowania sonifikacji. Nie rozumiem też dlaczego liście sałaty jałowiono, a piersi kurczaka nie. Ponadto ciekawi mnie czy zanurzenie sałaty w etanolu miało wpływ na jej strukturę i wygląd oraz czy taki model badawczy dobrze imitował produkt wyjściowy? Przede wszystkim jednak chciałabym dowiedzieć się, co skłoniło doktoranta do wyboru tak nietypowego modelu badawczego (produktu nietrwałego, na którym nota bene trudno, bez zepsucia, wytworzyć biofilm badanych bakterii). W celu oznaczenia „liczby komórek tworzących biofilm”, z liści sałaty zmywano komórki, natomiast w przypadku mięsa, całe jego badane fragmenty homogenizowano. Wskazane różnice w sposobie przygotowania próbek wymagają wyjaśnienia, zwłaszcza w kontekście wpływu tego procesu na oznaczaną wielkość, tj. biofilm. Z metodyki zamieszczonej w pracy nie wynika też jakie pH miał bufor SGF z dodatkiem 14 i 30% w/v CaCO₃. Mam też kilka uwag natury technicznej: i) w wykazie stosowanej aparatury znajduje się, pominięty w opisie, próżniowy system opróżniających; nie wiadomo do czego był stosowany, ii) w pracy nie oznaczano „liczb bakterii” (rozdz. 3.2.2, str. 40) tylko liczbę rosnących komórek bakterii, iii) zamiast wymieniać, że stosowano bufor o pH 2, 3, 4, ...13, lepiej było podać, że pH buforu wynosiło od 2 do 13 ($\Delta=1$), warto było również zamieścić informację o czynnikach wykorzystanych do korekty pH, iv) zapis „eradykacja pałeczek *Salmonella* z powierzchni poideł na modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt” jest wyjątkowo niefortunny – nie oddaje istoty badań, v) dla ścisłości pożywka LB (A&A Biotechnology) to LB agar, a mieszanie to nie to samo co wytrząsanie, vi) szczepy ATCC i NCTC nie pochodziły z Kolekcji Szczepów KBiMŻ UPWr, tylko były w niej przechowywane.

Dalsze uwagi dotyczą rozdziału pt. „Cel pracy”. W mojej ocenie podany w dysertacji cel badań, nie pokazuje w pełni ich zakresu. Brakuje w nim kluczowych zmiennych np. informacji o różnych szczepach wskaźnikowych i różnych mianach bakteriofagów, badaniach modelowych i badaniach w warunkach praktycznych, podejmowaniu wielotorowych działań, tj. w zakresie usuwania biofilmów oraz ograniczania ich rozwoju. Poza tym, w pierwszym „celu cząstkowym” zapomniano, o ważnych dla przebiegu kluczowych badań, koktajlach bakteriofagów, natomiast drugi źle sformułowano („Analiza zdolności redukcji koktajli bakteriofagów UPWR S1-5 i UPWR E1-4 przeciw tworzonemu biofilmom na powierzchni poideł dla drobiu z wykorzystaniem modelu eksperymentalnie zakażonych kurcząt”).

Pragnę jednocześnie zaznaczyć, że powyższe uwagi w żaden sposób nie negują założeń, skądinąd bardzo ciekawych badań, ani tym bardziej nie podważają ich zasadności. Mają jedynie na celu wyjaśnienie zasygnalizowanych zagadnień w celu lepszego zrozumienia ich istoty oraz określenia wagi odkryć doktoranta.

Rezultaty badań będących podstawą dysertacji, zostały przedstawione w 3 tabelach oraz na 34 wykresach, spośród których wykres 2 (Miano koktajlu bakteriofagów UPWr S134 po inkubacji w środowiskach o różnym pH) nie powinien mieć formy liniowej. Z danych zamieszczonych na wykresach wynika też bakteriofagi UPWr S1-5 i ich koktajl inkubowano w SGF z dodatkiem 14 i 30% CaCO₃, a bakteriofagi UPWr E1-4 i ich koktajl tylko w SGF z dodatkiem 14% CaCO₃. W przypadku tego ostatniego pominięto również badania dotyczące wpływu dodatku paszy. Nurtuje mnie więc pytanie dlaczego tak postąpiono?

Cześć wynikowa dysertacji składa się z dwóch podrozdziałów. W pierwszym z nich przedstawiono wyniki badań oceniających wpływ bakteriofagów na dwa szczepy *Salmonella* Enteritidis (różniące się m.in. antybiotykoopornością) oraz tworzony przez nie biofilm. Najpierw w warunkach modelowych oceniono zdolność wybranych szczepów do tworzenia biofilmu na polistyrenie i stali nierdzewnej, a następnie otrzymany biofilm potraktowano

pięcioma bakteriofagami o interesujących profilach aktywności oraz koktajlem złożonym z trzech bakteriofagów (o składzie ustalonym na potrzeby pracy). Wart podkreślenia jest fakt, że wszystkie bakteriofagi wykorzystane w pracy, stanowiły unikalny materiał badawczy (zostały pozyskane i charakteryzowane przez naukowców z UPWr) i nie były jak dotąd eksplorowane w kierunkach zaproponowanych w pracy. Już pierwsze badania dostarczyły ciekawych informacji. Wykazały bowiem, że antybiotykoopdopmy szczep *S. Enteritidis* 327 lux cechował się słabszym potencjałem w zakresie tworzenia biofilmu, ale niestety mimo to stanowił większe zagrożenie, gdyż jego biofilm był bardziej odporny na działanie testowanych bakteriofagów. Problemy związane z usuwaniem biofilmów *Salmonella* z powierzchni abiotycznych jeszcze bardziej uwypuklił fakt, że w badanych warunkach, żaden z bakteriofagów nie eliminował ich całkowicie. Prawdopodobnie wbrew oczekiwaniom, koktajl bakteriofagowy nie działał na nie lepiej od jego składowych. Aby móc w pełni ocenić potencjał aplikacyjny badanych fagów, w kolejnych badaniach wykorzystano je do obróbki powierzchni biotycznej, za której model wybrano liście sałaty. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie: dlaczego nie wybrano innych produktów, dużo bardziej narażonych na skażenia bakteriami *Salmonella*? Zastosowana obróbka spowodowała obniżenie liczebności komórek *Salmonella* na liściach sałaty o 0,5-3,5 cykla log. Wynik ten można uznać za dobrą prognozę na przyszłość. Niemniej jednak bardzo intryguje mnie, czy w trakcie dalszego przechowywania pozostały na liściach biofilm odbudowywał się? Proszę o podzielenie się swoimi obserwacjami w tym zakresie. Muszę również zwrócić uwagę na to, że redukcja liczby pałeczek *Salmonella* na liściach sałaty, z wyrażonego logarytmicznie poziomu prawie 7 do 3,5, to nie redukcja wynosząca 55%. Taką informację podano we wniosku nr 2. Najbardziej oryginalny charakter ma ostatnia seria eksperymentów, która została przeprowadzona z wykorzystaniem poidła dla drobiu, a zatem w warunkach imitujących warunki praktyczne. Takie podejście według mnie zasługuje na uznanie. Racjonalne przesłanki skłoniły doktoranta do wykorzystania w nich, tym razem tylko koktajlu bakteriofagowego. Dzięki ww. badaniom udało się m.in. stwierdzić, że jego dodatek do wody pitnej ograniczył na powierzchni poidła rozwój biofilmu, mierzonego liczbą zdolnych do wzrostu komórek *Salmonella*. Odkrycie to było bodźcem do zaplanowania kolejnych, dużo bardziej złożonych eksperymentów, tj. doświadczeń w warunkach chowu fermowego drobiu. Zaproponowany rozbudowany układ doświadczalny według mnie dowodzi, ambicji naukowych doktoranta i jego promotora. Wskazuje też wyraźnie na ukierunkowanie całej pracy na konkretne aplikacje. Ww. badania doprowadziły bowiem dodatkowo do odkrycia, że wprowadzenie bakteriofagów do wody minimalizuje skutki infekcji drobiu bakteriami *Salmonella*. W tym miejscu nasuwa mi się jednak szereg pytań: i) dlaczego *Salmonella* oznaczano w wątrobie, śledzionie i bursie Fabrycjusza, a nie np. w przewodzie pokarmowym i kałomoczu? ii) w jaki sposób zastosowana obróbka wpłynęła na kondycję zdrowotną (dobrostan) badanych kurczaków? iii) jakie było zanieczyszczenie samej wody bakteriami *Salmonella*? iv) czy zaobserwowane działanie było skutkiem mniejszej podaży bakterii *Salmonella* z wodą, czy może działania bakteriofagów w ich przewodzie pokarmowym; takiej ewentualności nie wykluczyły bowiem prowadzone równoległe badania modelowe dotyczące stabilności bakteriofagów. Dużym zaskoczeniem był dla mnie niewielki udział bakterii *Salmonella* w „wielkogatunkowych biofilmach,” naturalnie powstających w poidłach podczas eksperymentów hodowlanych (średnio *Salmonella* 10^1 - 10^2 jtk/cm² vs. inne bakterie 10^6 - 10^8 jtk/cm²). Czy wiadomo może jakie bakterie były głównymi komponentami wykrytych biofilmów? Nie jestem również przekonana, czy na podstawie jednostkowych oznaczeń (wykres 18, brak powtórzeń) i do tego wykonanych tylko metodą posiewów ilościowych, można jednoznacznie stwierdzić, że „koktajl bakteriofagów UPWR S134 całkowicie eliminuje pałeczki *Salmonella* Enteritidis z tego wielogatunkowego biofilmu...” (wniosek 3). Z wykresu 18 wynika, że biofilm w trakcie badań ulegał dynamicznym zmianom

– zanikał, a następnie odbudowywał się. Czy zatem, nie wykrycie w nim obecności w 9 dobie (punkt końcowy badań) *Salmonella* upoważnia do tak jednoznacznego wniosku?

Analogiczna seria doświadczeń, z wyjątkiem badań hodowlanych, została przeprowadzona z wykorzystaniem dwóch szczepów *E. coli* oraz czterech aktywnych w stosunku do nich bakteriofagów i ich koktajlu. Poczynione w trakcie nich obserwacje były w dużej mierze zbieżne do odnotowanych w badaniach z *Salmonella*, z jedną zasadniczą różnicą – szczepy *E. coli* cechowały się słabszymi predyspozycjami do tworzenia biofilmu, a ich biofilm był bardziej odporny na działanie badanych bakteriofagów. „Biofilm” *E. coli* dobrze rozwijał się za to na powierzchni mięsa drobiowego przechowywanego nawet w warunkach chłodniczych. Tempo jego rozwoju można było jednak ograniczyć poprzez wstępną obróbkę mięsa (kąpiel zawieszoną fagów. Efekt ten niestety częściowo zanikał po przerwaniu łańcucha chłodniczego. Obróbka fagami nie zapobiegła zatem dalszemu rozwojowi *E. coli*. Wyniki te najlepiej pokazują, jak trudnym zadaniem jest opracowanie dobrych metod walki z biofilmami bakteryjnymi, a zwłaszcza z tymi opornymi na działanie antybiotyków.

Wyniki badań dysertacyjnych mgr inż. P. Korzeniowski poddał analizie w odniesieniu do dostępnej literatury. Z merytorycznego punktu widzenia dyskusja wyników została przeprowadzona poprawnie, choć bardzo pobieżnie. Doktorant nawiązał w niej do wyników badań innych autorów o podobnym charakterze. W mojej ocenie mógł on jednak lepiej skomentować wyniki badań własnych, a nade wszystko postarać się połączyć je w bardziej logiczną całość. Szkoda również, że doktorant nie spojrzął szerzej na swoje dokonania i nie wskazał, które z nich wymagają dalszych badań (nie zarysował dokładnie dalszego kierunku badań związanych z przedmiotem pracy). Ważę dokonań doktoranta mogłoby też podnieść ich zestawienie z wynikami badań dotyczących usuwania biofilmów metodami innymi od przedstawionych w pracy. Pokazałoby to na ile metoda zaproponowana w pracy, jest konkurencyjna w stosunku do innych metod. Nam jeszcze drobną uwagę. W dyskusji wyników wielokrotnie podano, że „Wyniki przedstawione w literaturze potwierdzają uzyskane w pracy wyniki”. Czy to na pewno właściwy kierunek analizy danych?

Podsumowaniem dysertacji jest 7 wniosków, które z uwagi na niestaranność edytorską zostały źle ponumerowane. Zauważam też, że wnioski zamieszczone w pracy mają nietypową formę. Każdy z nich został poprzedzony wprowadzeniem nawiązującym do oczywistych danych. Niestety przez ten zabieg, granica pomiędzy wnioskami wynikającymi z rzeczywistych dokonań doktoranta, a danymi literaturowymi została trochę zatarta. Wnioski 2 oraz 4, zawierające informacje o (%) redukcji liczby bakterii, odpowiednio *Salmonella* i *E. coli*, wymagają korekty. Według mnie we wnioskach warto też uwzględnić inne aspekty poruszone w recenzji. Przede wszystkim jednak sugeruję aby w końcowej publikacji postarać się uogólnić swoje obserwacje.

Na koniec pragnę zaznaczyć, że wszystkie poczynione przeze mnie uwagi nie wpływają pozytywną ocenę całej dysertacji. Większość z nich ma formę luźnych refleksji, sugestii i pytań, które zostały podyktowane ciekawością recenzenta oraz chęcią wywołania dyskusji z doktorantem.

Reasumując, całą dysertację oceniam pozytywnie. Doceniam trud wniesiony w jej powstanie oraz kierunek przeprowadzonych prac eksperymentalnych. Doktorant osiągnął założone cele badawcze uzyskując wyniki będące uzupełnieniem obecnego stanu wiedzy na temat zdolności bakterii *Salmonella* i *E. coli* do tworzenia biofilmów na powierzchniach abiotycznych i biotycznych oraz ich wrażliwości na działanie specyficznych bakteriofagów litycznych. Ze względu na charakter przeprowadzonych badań, wyniki przedstawione w dysertacji mają również wartość aplikacyjną. Mogą być punktem wyjścia do opracowania nowych procedur usuwania biofilmów z otoczenia związanego z produkcją żywności. Poprzez to w perspektywie mogą przyczynić się też do poprawy jakości i bezpieczeństwa żywności.

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska pana mgra inż. Pawła Korzeniowskiego pt. „Biofilmy w produkcji żywności i rola bakteriofagów w ich eradykacji”, **spełnia warunki** określone w art. 187 ust. 1-4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2023, poz. 1668 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o **dopuszczenie Autora rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

prof. UPP dr hab. Anna Słp

profesor Uczelni