

Streszczenie

Globalny problem rosnącej oporności patogenów bakteryjnych na środki przeciwdrobnoustrojowe i wiążące się z nim niepowodzenia w leczeniu infekcji, skłaniają do poszukiwania nowych, alternatywnych metod terapii. Badania dotyczące wpływu pola magnetycznego (PM) na parametry funkcjonalne bakterii są prowadzone przez wiele zespołów badawczych na całym świecie. Jednym ze stosunkowo nowych kierunków badań jest analiza wpływu PM na efektywność działania środków przeciwdrobnoustrojowych wobec bakterii. Jednakże, często badania takie prowadzone są w sposób, który nie obejmuje w analizie części czynników mogących wpływać na obserwowane efekty i tym samym, uzyskane wyniki nie dostarczają satysfakcjonującego wyjaśnienia obserwowanych zjawisk. Dlatego też, wskazane wydaje się prowadzenie dalszych badań w tym zakresie, jak również systematyzacja ich prowadzenia.

Podstawowym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza wpływu wirującego pola magnetycznego (WPM) na efektywność działania antybiotyków wobec bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus*, w tym szczepów metycylinoopornych (ang. *methicillin-resistant S. aureus*, MRSA) oraz metycylinowrażliwych (ang. *methicillin-susceptible S. aureus*, MSSA). Ponadto, rozprawa doktorska była próbą usystematyzowania sposobu prowadzenia analiz dotyczących wpływu PM na różne parametry funkcjonalne bakterii.

Wszystkie eksperymenty przeprowadzone w ramach opisanego osiągnięcia naukowego wykonano z wykorzystaniem stanowisk badawczych wyposażonych w bioreaktory wspomagane WPM, zbudowane ze stojanu elektrycznego silnika trójfazowego oraz komory procesowej, w której w trakcie ekspozycji umieszczano hodowle bakterii. W badaniach wykorzystano zarówno kliniczne, jak i referencyjne szczepy bakterii należące do 8 gatunków (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella catarrhalis* i *Bacillus cereus*), przy czym eksperymenty związane z efektywnością działania antybiotyków przeprowadzono wyłącznie z użyciem szczepów *S. aureus* (w tym szczepów MRSA i MSSA). W analizach uwzględniono różne parametry związane z ekspozycją bakterii na WPM (np. częstotliwość WPM w zakresie od 5 do 50 Hz i czas ekspozycji w zakresie od 1 do 18 godzin) oraz antybiotyki z różnych grup, charakteryzujące się odmiennym mechanizmem działania, a także różnymi ładunkami elektrycznymi. Przeprowadzone analizy związane były z wpływem WPM na kinetykę wzrostu i komórkową aktywność metaboliczną bakterii oraz efektywność działania antybiotyków.

Uzyskane wyniki wykazały, że oddziaływanie WPM na takie parametry jak kinetyka wzrostu oraz komórkowa aktywność metaboliczna, nie zależą wyłącznie od parametrów opisywanych dotąd w literaturze (np. od gatunku bakterii, kształtu komórki, budowy ściany komórkowej, czy też od rodzaju i parametrów PM i czasu ekspozycji), ale również, w istotnym stopniu od zróżnicowania szczepów bakteryjnych w obrębie gatunku (w tym nawet szczepów należących do jednego typu klonalnego). Ustalono również, że efektywność działania antybiotyków z różnych grup, w tym aminoglikozydów, β -laktamów, fluorochinolonów, glikopeptydów, linkozamidów makrolidów i tetracyklin wobec *S. aureus* wzrasta pod wpływem WPM. Szczególnie znaczące zmiany obserwowane były w odniesieniu do antybiotyków, których mechanizm działania związany jest hamowaniem syntezy ściany

bakteryjnej (β -laktamy i glikopeptydy). Wykazano, że zmiany w efektywności działania β -laktamów były spowodowane osłabieniem komórek bakteryjnych pod względem strukturalnym. Wśród obserwowanych zmian stwierdzono deformacje kształtu i zmiany w wielkości komórek, a także zapadanie się ścian komórkowych i utratę turgoru komórkowego.

W ramach prowadzonych analiz dowiedziono również, że na zmiany w efektywności działania antybiotyków wobec bakterii ekspozycyjnych na WPM wpływ mają takie czynniki jak: częstotliwość WPM, czas ekspozycji oraz stężenie antybiotyku. Wykazano ponadto, że zmiany w efektywności działania antybiotyków pod wpływem WPM są, podobnie jak kinetyka wzrostu oraz komórkowa aktywność metaboliczna, również ściśle związane ze zróżnicowaniem szczepów w obrębie gatunku. Wykazano również, że zmiany w efektywności działania antybiotyków β -laktamowych wobec bakterii manifestują się jedynie w obecności WPM i nie pozostają one utrwalone w komórkach po zaprzestaniu ekspozycji. Udowodniono także, że choć WPM ma wpływ na uwalnianie antybiotyków z nośnika oraz ich dyfuzję w agarze, nie jest to czynnik istotnie determinujący efektywność działania antybiotyków wobec bakterii.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej istotnie pogłębiły wiedzę dotyczącą zmian w efektywności działania antybiotyków pod wpływem WPM wobec bakterii z gatunku *S. aureus*. Ponadto, po raz pierwszy w tak szczegółowy i kompleksowy sposób przeanalizowano wpływ WPM na komórki bakteryjne. Istotnym osiągnięciem, wynikającym z przeprowadzonych analiz, jest również stworzenie spójnej bazy metodologicznej, która może przyczynić się do systematyzacji badań związanych z wpływem PM na różne parametry funkcjonalne oraz efektywność działania środków przeciwdrobnoustrojowych wobec bakterii.

Marta Nowoszyło

Abstract

The global problem of increasing resistance of bacterial pathogens to antimicrobials and the associated failures in treating infections are prompting the search for new alternative therapies. Research on the effects of magnetic field (MF) on the functional parameters of bacteria is being conducted by many research teams around the world. Relatively new line of research is the analysis of the effect of MF on the effectiveness of antimicrobials against bacteria. However, often such studies are conducted in a way that does not include in the analysis some of the factors that can affect the observed effects, and thus, the results obtained do not provide a satisfactory explanation of the observed phenomena. Therefore, it seems advisable to conduct further research in this area, as well as to systematize conducting the research.

The main objective of the dissertation was to analyze the effect of rotating magnetic field (RMF) on the effectiveness of antibiotics against *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) strains. In addition, the doctoral dissertation was an attempt to systematize the methodological approaches for analyses on the effects of MF on various functional parameters of bacteria.

All experiments carried out as part of the scientific achievement described herein were performed using RMF bioreactors made of a three-phase electric motor stator and a process chamber in which cultures of bacteria were placed during exposure. Both clinical and reference bacterial strains belonging to 8 species (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella catarrhalis* and *Bacillus cereus*) were used in the study, with experiments related to antibiotic efficacy carried out exclusively with *S. aureus* strains (including MRSA and MSSA strains). Various parameters related to RMF exposure (e.g. RMF frequency ranging from 5 to 50 Hz and exposure time ranging from 1 to 18 hours) and antibiotics from different groups, characterized by different mechanisms of action, as well as different electrical charges. The analyses carried out were related to the effect of RMF on the growth kinetics and cellular metabolic activity of bacteria and the effectiveness of antibiotics.

The results obtained showed that the effect of RMF on parameters such as growth kinetics and cellular metabolic activity does not depend solely on the parameters described so far in the literature (e.g. bacterial species, cell shape, cell wall structure, or the type and parameters of MF and exposure time), but also, to a significant extent, on the diversity of bacterial strains within a species (including even strains belonging to a single clonal type). It was also found that the efficacy of antibiotics from different groups, including aminoglycosides, β -lactams, fluoroquinolones, glycopeptides, macrolides lincosamides and tetracyclines against *S. aureus* increases under influence of the RMF. Particularly significant changes were observed for antibiotics whose mechanism of action is related to inhibition of bacterial wall synthesis (β -lactams and glycopeptides). Changes in the effectiveness of β -lactams were shown to be due to structural weakening of bacterial cells. Among the changes observed were deformations in cell shape and changes in cell size, as well as cell wall collapse and loss of cell turgor.

The analyses also demonstrated that changes in the effectiveness of antibiotics against bacteria exposed to RMF are influenced by factors such as RMF frequency, exposure time and antibiotic concentration. It was further shown that changes in antibiotic efficacy under RMF

are, like growth kinetics and cellular metabolic activity, also closely related to strain variation within species. It has also been shown that changes in the efficacy of β -lactam antibiotics against bacteria are only manifested in the presence of RMF and do not remain fixed in cells after exposure. It has also been shown that, although RMF affects the release of antibiotics from the carrier and their diffusion in the agar, it is not a significant determinant of the effectiveness of antibiotics against bacteria.

The results obtained in the course of this dissertation have significantly advanced the knowledge of changes in the effectiveness of antibiotics under the influence of RMF against *S. aureus* bacteria. In addition, this is the first time when the effect of RMF on bacterial cells has been analyzed in such a detailed and comprehensive manner. An important achievement, resulting from the analyses, is the creation of a consistent methodological basis that can enable the systematization of studies related to the effects of MF on various functional parameters and the effectiveness of antimicrobials against bacteria.

Marta Woroszyło

Olsztyn, 14.09.2023

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Woroszyło:

**Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na
efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii
patogennych**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT
na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie, w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do recenzji praca jest cyklem trzech badawczych, powiązanych tematycznie publikacji, opatrzonych wspólnym tytułem: **Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii patogennych.**

W skład pracy wchodzi trzy anglojęzyczne prace opublikowane w czasopismach z listy JCR.

W skład cyklu wchodzi:

1. Woroszyło M., Ciecholewska-Juśko D., Junka A., Pruss A., Kwiatkowski P., Wardach M., Fijałkowski K. (2021). The impact of intraspecies variability on growth rate and cellular metabolic activity of bacteria exposed to rotating magnetic field. *Pathogens*.10 (11), 1427.
2. Woroszyło M., Ciecholewska-Juśko D., Junka A., Wardach M., Chodaczek G., Dudek B., Fijałkowski K. (2021). The effect of rotating magnetic field on susceptibility profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains exposed to activity of different groups of antibiotics. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (21), 11551

3. Woroszyło M., Ciecholewska-Juśko D., Junka A., Drozd R., Wardach M., Migdał P., Szymczyk-Ziółkowska P., Styburski D., Fijałkowski K. (2021). Rotating magnetic field increases β -lactam antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. International Journal of Molecular Sciences. 22 (22), 12397

Dwie prace opublikowano w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences i jedną w Pathogens. Wszystkie prace opublikowano w uznanych czasopismach z zakresu dziedziny nauk rolniczych, dyscypliny biotechnologia. Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) tych publikacji jest wysoki, wynosi 16,942. Wszystkie prace są wieloautorskie (7-9 autorów). Po zapoznaniu się z publikacjami które są wyjątkowo obszerne jak na prace badawcze (24-29 stron) zawierają bardzo dużą liczbę analiz przeprowadzonych różnymi technikami badawczymi z różnych obszarów nauki, liczba współautorów jest dla mnie jak najbardziej adekwatna do przeprowadzonych badań. Między innymi prowadzono badania molekularne, analizy z użyciem mikroskopu konfokalnego oraz skaningowego mikroskopu elektronowego oraz analizy w użyciu chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas. Po zapoznaniu się z oświadczeniami współautorów oraz Doktorantki nie mam wątpliwości, że miała Ona wiodący udział w ich powstawaniu. Doktorantka jest pierwszym Autorem we wszystkich publikacjach, brała udział w opracowywaniu koncepcji i metodologii badań, wykonywała znaczną część analiz, opracowywała wyniki i czynnie brała udział w procesie publikacyjnym. Zaplanowanie tak dużej liczby doświadczeń, znalezienie odpowiednich osób i „zebranie wszystkiego” tak aby powstały publikacje wymagało dużego zaangażowania, skrupulatności i umiejętności współpracy.

Cykl publikacji Doktorantka poprzedziła dobrze przygotowanym wstępem teoretycznym, przedstawiła hipotezy oraz cel pracy, materiały i metody badawcze, omówiła wyniki i przedstawiła wnioski. Było to zapewne trudne zadanie aby tak obszerne badania zawrzeć w tak syntetycznym opisie, ale w moim odczuciu udało się w pełni osiągnąć zamierzony cel, przy każdym punkcie znajdują się odnośniki do publikacji więc bez problemu można odnaleźć omawiane etapy w konkretnych artykułach. Ponadto Doktorantka przedstawiła swoje dotychczasowe osiągnięcia naukowe z okresu studiów doktoranckich, oraz aktualnie realizowane badania co pozwoliło Recenzentowi utwierdzić się w przekonaniu, że Pani mgr inż. Marta Woroszyło jest bardzo ambitną i pracowitą osobą o czym świadczą liczne doniesienia konferencyjne, aktywne uczestnictwo w kole naukowym oraz pozostałe nie wchodzące w skład pracy doktorskiej artykuły naukowe .

Ocena merytoryczna pracy

Według WHO rosnąca oporność na antybiotyki jest poważnym zagrożeniem i jest obecnie jednym z największych problemów zdrowia publicznego. Uważam, że praca doktorska Pani mgr inż. Marty Woroszyło której głównym celem była analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania antybiotyków względem bakterii patogennych wpisuje się w nurty aktualnych badań naukowych. Doktorantka poza podstawowym celem przedstawiła również dziewięć celów szczegółowych które konsekwentnie realizowała w poszczególnych etapach badań. W pierwszym etapie badań oceniała wpływ wirującego pola magnetycznego na komórkową aktywność metaboliczną bakterii. Przeprowadzone badania były kompleksowe, obejmowały zarówno pałeczki, laseczki jak i ziarniaki różnych rodzajów i gatunków bakterii, przeprowadzono analizy na kilku szczepach tego samego gatunku co pozwoliło Doktorantce stwierdzić, że wpływ wirującego pola magnetycznego w znacznym stopniu jest szczepo-zależny.

Kolejne etapy badań skupiały się na kilku szczepach *Staphylococcus aureus*, zarówno metycylinoopornych jak i metycylinowrażliwych. Doktorantka uzasadniła wybór tego gatunku ziarniaków i zgadzam się z nią, że zarówno ogromny potencjał chorobotwórczy, zdolność do nabywania oporności oraz rozpowszechnienie w środowisku naturalnym predysponuje te drobnoustroje do jak największej uwagi badaczy. Doktorantka oznaczyła u badanych izolatów gen *mecA* oraz określiła pokrewieństwo genetyczne z użyciem techniki PFGE. Przeprowadziła szereg analiz, które bardzo dobrze opisała i udokumentowała w przygotowanych publikacjach. Wykonała między innymi ocenę wpływu wirującego pola magnetycznego na liczbę komórek *S. aureus* zdolnych do wzrostu na podłożu stałym, wykonała analizę zmian w efektywności działania antybiotyków oraz określiła efekt poekspozycyjny. Doktorantka wykazała się dużą dociekliwością i chęcią bardzo dokładnego zbadania wpływu wirującego pola magnetycznego na komórki *S. aureus*, w tym celu przeprowadziła analizę zmian w morfologii komórek, zmian w integralności ścian komórkowych w biofilmie oraz określiła liczbę żywych i martwych komórek z użyciem fluorescencji. Bardzo ciekawym elementem badań jest moim zdaniem analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na uwalnianie antybiotyków z krążków bibułowych oraz ich dyfuzję w agarze. Ten element badań wskazuje na bardzo skrupulatne podejście do badań, dociekliwość oraz chęć wyciągnięcia poprawnych wniosków i wyeliminowanie tych elementów które mogłyby w tym przeszkodzić. Za niezmiernie istotne uważam wykazanie, że wirujące pole magnetyczne zaburza integralność ścian komórkowych

S. aureus w biofilmie bez względu na jego grubość oraz gęstość komórek w jego poszczególnych warstwach.

Na zakończenie Autorka sformułowała dziewięć wniosków przedstawiających jej osiągnięcia poprzedzając je streszczeniem wyników wraz z komentarzami do nich. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka właściwie zaplanowała badania, wykonała ogrom pracy laboratoryjnej i umiejętnie wszystko opisała stosując również metody statystyczne które ułatwiły wyciągnięcie wniosków.

Zawarte w cyklu „Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii patogennych: prace są już opublikowane w renomowanych czasopismach i poddane recenzjom, i ja również oceniam je bardzo pozytywnie. Pozwolę sobie sformułować kilka pytań, do których poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się/dyskusję:

- dlaczego analizy wpływu WMP na zmiany w liczebności żywych i martwych komórek wykonano po 12 godzinach a ocenę zmian w kinetyce wzrostu i komórkowej aktywności metabolicznej zakończono po 9 godzinach
- w celu analizy zmian w efektywności działania antybiotyków w wirującym polu magnetycznym wykonano ocenę wrażliwości na antybiotyki metodą dyfuzyjno-krażkową wg wytycznych EUCAST, w jakim celu hodowle eksponowano na wirujące pole magnetyczne przez 12 godzin, mierzono dające się odczytać strefy zahamowania wzrostu a następnie prowadzono inkubację bez działania wirującego pola magnetycznego? Z jakiego powodu nie inkubowano hodowli przez cały rekomendowany przez EUCAST czas w wirującym polu magnetycznym.
- zastosowano niezmiernie skomplikowaną i pracochłonną metodę oceny wpływu wirującego pola magnetycznego na liczbę komórek *S. aureus*. zdolnych do wzrostu na podłożu stałym. Zawiesiny szczepów posiewano na podłoże Muller-Hinton, inkubowano w wirującym polu magnetycznym przez 12 godzin, następnie wykonywano ‘zmyw’ kolonii z użyciem PBS, posiewano na podłoże BHIA i inkubowano kolejne 24 godziny bez wpływu wirującego pola magnetycznego. Doktorantka wyjaśniła że eksperyment ten wykonano w celu oceny potencjału bakteriobójczego samego WMP wobec eksponowanych bakterii. Czy nie wystarczyłoby w tym celu posiać powierzchniowo rozcieńczoną hodowlę o potencjalnie policzalnej liczbie bakterii np. 10^2 - 10^3 cfu/ml, zastosować jedno podłoże hodowlane, porównać liczbę kolonii na płytkach eksponowanych i kontrolnych?
- podczas analiz zmian w integralności ścian komórkowych hodowli w biofilmie traktowanym cefoksytyną i eksponowanych na wirujące pole magnetyczne stosowano hodowlę bakteryjną o

gęstości 1×10^5 cfu/ml, mam pytanie czysto techniczne, w jaki sposób przygotowano tak ściśle określoną gęstość hodowli, w pozostałych eksperymentach podawano przybliżone wartości co jest dla mnie zrozumiałe.

WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Marty Woroszyło pt.: „Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii patogennych”, spełnia wymagania zapisane w art. 13 ust. 1 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz. U. z 203 r. Nr 65, poz. 595; z późn. zm.), jest bowiem samodzielnym i wartościowym dorobkiem naukowym, prezentuje wysoki poziom merytoryczny oraz wnosi do nauki wiele elementów poznawczych i ma znaczną wartość aplikacyjną.

Proszę Radę Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o przyjęcie pracy i dopuszczenie Panią mgr inż. Martę Woroszyło do publicznej obrony zawartych w niej tez. Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową i aplikacyjną recenzowanej pracy wnoszę o jej wyróżnienie.

Anne Zade-Pawlik

Lublin, 25 sierpnia 2023

Monika Janczarek
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
tel. 81-537-59-09
monika.janczarek@mail.umcs.pl

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Woroszyło

pt. „Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych względem bakterii patogennych” („Analysis of the influence of rotating magnetic field on the effectiveness of antimicrobials against pathogenic bacteria”)
w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie biotechnologia

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Promotorem tej rozprawy jest dr hab. inż. Karol Fijałkowski, prof. ZUT.

Recenzję ww. pracy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pismo nr L.dz:WBiHZ/99/2023 z dnia 17 lipca 2023 r. przesłane przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Naukowej „Zootechnika i Rybactwo” dr hab. inż. Małgorzatę Ożgo, prof. ZUT.

Przedstawiona do oceny praca doktorska zawiera osiągnięcia opisane w trzech powiązanych tematycznie pracach eksperymentalnych opublikowanych w roku 2021 w otwartym dostępie (Open Access) w czasopismach MDPI, tj. w Pathogens (1 praca, D-1) oraz International Journal of Molecular Sciences (2 prace, D-2 i D-3) o sumarycznym współczynniku oddziaływania (impact factor) IF 16,947 i 380 pkt. MEiN. We wszystkich trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Swoją udział oszacowała na 65% w pierwszej publikacji (7 autorów), 65% w drugiej (7 autorów) i 60% w trzeciej publikacji (9 autorów). Procentowy udział w realizacji tych publikacji przedstawiony przez Doktorantkę został w mojej ocenie nieco zawyżony (szczególnie w pracy D-3), gdyż są to prace wieloautorskie. Należy założyć, że dla osoby, której wkład w powstawanie publikacji był na tyle istotny, że została ona współautorem publikacji, należałoby

uwzględnić co najmniej 5% udział. Niemniej, ta uwaga nie umniejsza znacząco mojej bardzo dobrej całościowej opinii na temat przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Przedstawione badania miały charakter interdyscyplinarny i były realizowane we współpracy z ekspertami z różnych obszarów nauk inżynierskich, przyrodniczych oraz medycznych w ramach projektu finansowanego ze źródeł Narodowego Centrum Nauki (OPUS 14), którego Promotor był kierownikiem. Specyfika i wielowątkowość prowadzonych badań uzasadnia powstanie publikacji wieloautorских. Dzięki ogromnemu wsparciu merytorycznemu i dużemu doświadczeniu naukowemu dr. hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT, Pani mgr inż. Marta Woroszyło mogła uzyskać wiele wartościowych wyników o bardzo dużym potencjale aplikacyjnym. Przyczyniło się to do uzyskania pracy doktorskiej na bardzo wysokim poziomie naukowym. Należy podkreślić, że oprócz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Doktorantka jest również współautorem 4 publikacji z listy JCR. O dużej aktywności naukowej Pani mgr inż. Marty Woroszyło świadczy także Jej udział w realizacji projektów i zleceń badawczych jako wykonawca oraz udział w licznych konferencjach naukowych, szkoleniach i praktykach.

Problem badawczy

Tematyka badawcza podjęta przez mgr inż. Martę Woroszyło i zespół dr. hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT jest bardzo ważna i aktualna ze względu na duże zagrożenie zdrowia ludzi i zwierząt powodowane przez patogenne bakterie, ze szczególnym uwzględnieniem *Staphylococcus aureus*. Globalny problem rosnącej oporności bakterii patogennych na substancje przeciwdrobnoustrojowe, w tym antybiotyki, i wynikające z tego trudności w leczeniu infekcji spowodowanych wielolekoopornymi bakteriami, zmusza do intensywnego poszukiwania nowych alternatywnych metod terapeutycznych. Bardzo ciekawym i obiecującym podejściem w tym zakresie jest zastosowanie pola magnetycznego do wzmacniania efektów działania różnych środków przeciwdrobnoustrojowych. Z tych powodów tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę i zespół dr. hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT doskonale wpisuje się w aktualne potrzeby terapeutyczne.

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wszystkie wymogi formalne. Tytuł pracy w pełni odpowiada treściom w zawartym w rozprawie, a opisywane zagadnienia dotyczą aktualnych kierunków badań związanych z określeniem wpływu wirującego pola magnetycznego (WPM) na efekt działania antybiotyków wobec bakterii *S. aureus*, zarówno szczepów metycylinoopornych (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), jak i szczepów metycylinowrażliwych (methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA). W pracy opisano wyniki analiz mających na celu ustalenie wpływu WPM na różne parametry fizjologiczne badanych szczepów bakterii. Przedstawiona do oceny praca doktorska jest obszernym opracowaniem (185 stron),

które zawiera wszystkie wymagane elementy dla tego typu prac naukowych, tj.: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie do tematyki badawczej, hipotezy, cel pracy, syntetyczny opis wykorzystanych materiałów i metod badawczych oraz uzyskanych wyników, wnioski, spis cytowanej literatury, omówienie pozostałych osiągnięć naukowych, kopie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów publikacji. Z oświadczeń współautorów publikacji wynika, że wkład Doktorantki w wykonanie eksperymentów, analizę wyników i przygotowanie manuskryptów publikacji, wchodzących w skład pracy doktorskiej był dominujący (65% w pierwszej, 65% w drugiej i 60% w trzeciej pracy). Praca doktorska została przygotowana bardzo starannie i szczegółowo, zarówno pod względem naukowym, jak też graficznym i językowym, dzięki czemu czytało się ją z dużą przyjemnością.

Rozdział „Wprowadzenie” zawiera zwięzły opis (6 stron) własności szczepów MRSA i MSSA *S. aureus*, będących obiektem badań, w tym znaczenia tworzonego przez nie biofilmu dla trudności w eliminowaniu infekcji powodowanych przez te bakterie, jak również opis różnych rodzajów pól magnetycznych wykorzystywanych w badaniach z użyciem organizmów żywych. W mojej ocenie, podjęty temat badawczy jest bardzo ważny, gdyż *S. aureus* został zaklasyfikowany do grupy patogenów ESKAPE, ze względu na jego zdolność do szybkiej adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych (w tym również leków przeciwbakteryjnych i dezynfektantów) i występowanie w obrębie tego gatunku wielu szczepów wielolekoopornych. Doktorantka opisała w sposób zwięzły aktualny stan wiedzy w tym temacie wraz z cytowaniem licznej literatury, co jest bardzo dobrym wprowadzeniem do części eksperymentalnej pracy doktorskiej.

Podobnie hipotezy i cel pracy doktorskiej zostały sformułowane jasno i precyzyjnie. Doktorantka postanowiła zbadać (i) czy wpływ WPM na wybrane cechy fizjologiczne bakterii patogennych, takie jak: kinetyka wzrostu i aktywność metaboliczna, jest uzależniony od zróżnicowania szczepów w obrębie gatunku (publikacja D-1) i czy (ii) zwiększenie efektywności działania antybiotyków w obecności WPM względem bakterii *S. aureus* jest zależne od mechanizmu ich działania oraz stężenia, zróżnicowania szczepów w obrębie gatunku, a także od czasu ekspozycji i częstotliwości zastosowanego WPM (publikacje D-2 i D-3). Cel ten osiągnięto w pełni poprzez konsekwentną realizację licznych szczegółowych zadań, które dotyczyły ustalenia wpływu WPM na kinetykę wzrostu, morfologię, żywotność komórek *S. aureus* i ich aktywność metaboliczną w formie planktonicznej oraz w biofilmie, na efektywność działania antybiotyków wobec *S. aureus*, na uwalnianie antybiotyków z krążków bibułowych oraz ich dyfuzję w agarze, oceny zmian w efektywności działania antybiotyków wobec *S. aureus* preeksponowanych na WPM (efekt poeksponacyjny), jak też usystematyzowania sposobu prowadzenia analiz dotyczących wpływu PM na parametry funkcjonalne bakterii oraz efektywność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych. Wybrany cel

badawczy był bardzo szeroko zakrojony, lecz mimo tego osiągnięto go w pełni, realizując konsekwentnie powiązane ze sobą zadania badawcze.

Rozdział „Materiały i metody” (6 stron) – ta część pracy została opisana przez Doktorantkę zwięźle ale wyczerpująco, ze wskazaniem jakie analizy były wykonywane we współpracy z innymi naukowcami. Podobnie rozdział „Wyniki” (5 stron) zawiera syntetyczny opis najważniejszych wyników uzyskanych w ramach tego osiągnięcia naukowego, które zostały skrupulatnie podsumowane w rozdziale „Wnioski”.

W mojej ocenie praca doktorska mgr inż. Marty Woroszyło jest bardzo wartościowym opracowaniem naukowym obejmującym kompleksową analizę wpływu WPM na różne aspekty fizjologiczne bakterii patogennych, w tym bardzo groźnej dla człowieka i zwierząt bakterii *S. aureus*. Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że badania w tym temacie nie były prowadzone w tak szerokim zakresie. W pierwszej pracy (**Pathogens 2021**), Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę aktualnego stanu wiedzy na temat wpływu różnych rodzajów pola magnetycznego na żywotność, wzrost i profil metaboliczny patogennych bakterii należących do różnych gatunków. W przeciwieństwie do analiz prowadzonych wcześniej przez innych naukowców, które dotyczyły tylko wybranych szczepów referencyjnych z danego gatunku bakterii, Doktorantka przeprowadziła analizy z użyciem większej liczby szczepów, tj. co najmniej 4 szczepy z każdego spośród 8 badanych gatunków bakterii: *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella catarrhalis* i *Bacillus cereus*, które różniły się pod względem budowy osłon komórkowych (bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne), kształtem komórek, ruchliwością oraz zdolnością do tworzenia spor. Doktorantka poczyniła bardzo ciekawe obserwacje wskazujące, że już tak niska wartość WPM jak 5 Hz powodowała zmiany we własnościach bakterii i dalsze zwiększanie WPM do 50 Hz nie wpływało drastycznie na zwiększenie efektów jego działania. Ponadto Doktorantka wykazała, że występuje duże zróżnicowanie efektów powodowanych przez WPM (pozytywne, negatywne lub brak efektu), nie tylko w odniesieniu do poszczególnych gatunków bakterii, ale także w dużym stopniu jest zależne od własności fizjologicznych poszczególnych szczepów bakterii. W mojej ocenie to bardzo interesujący i ważny wynik, potwierdzający zróżnicowaną wrażliwość różnych szczepów tego samego gatunku bakterii w stosunku do tego czynnika stresowego. Co ciekawe i bardzo istotne ze względów aplikacyjnych, to fakt, iż WPM wykazuje skuteczność działania już przy bardzo niskich wartościach (5 Hz) i krótkim czasie ekspozycji (pierwsze efekty były obserwowane już po 1 godz.). W związku z tym, mam pytanie do Doktorantki, jak można byłoby te informacje wykorzystać biotechnologicznie? Czy wykonując globalną analizę porównawczą między gatunkami bakterii Gram+ i Gram- można byłoby zaobserwować jakieś dodatkowe korelacje?

W kolejnym etapie prac mgr inż. Marta Woroszyło wraz z pozostałym zespołem badawczym postanowiła sprawdzić czy WPM wpływa na zmianę wrażliwości antybiotykowej metycylinoopornych szczepów *S. aureus*. W drugiej publikacji (**Int. J. Mol. Sci. 2021,22**), Doktorantka opisała uzyskane w tym

zakresie wyniki. Przy użyciu krążków bibułowych nasączonych antybiotykami o różnym mechanizmie działania oraz E-testów i technice pomiaru stref zahamowania wzrostu bakterii na płytkach z agarem (bakterie były potraktowane WPM 5 i 50 Hz), Doktorantka wykazała zwiększenie wrażliwości testowanych szczepów MRSA jedynie na antybiotyki β -laktamowe (tj. cefoksytynę, amoksylicynę i amoksylinę z kwasem klawulanowym), które powodują zahamowanie biosyntezy ściany komórkowej bakterii. Co ciekawe, podobne efekty zaobserwowano dla obu testowanych wartości WPM. Natomiast nie wykazano zbyt dużego wpływu WPM na ilość uwalnianych antybiotyków z krążków bibułowych w przypadku większości stosowanych związków. Obserwacje poczynione przez Doktorantkę sugerowały, iż WPM może działać na bakterie na etapie tworzenia osłon komórkowych. Dlatego logiczną konsekwencją tych działań było sprawdzenie działania WPM i jednego z przedstawicieli antybiotyków β -laktamowych (cefoksytyny) na integralność ściany komórkowej *S. aureus* w biofilmie. W mojej ocenie za szczególnie cenne uważam wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu mikroskopii konfokalnej i barwników specyficznych dla żywych i martwych komórek bakterii (SYTO-9 i jodek propidyny), które potwierdziły tę hipotezę i dodatkowo wykazały, że WPM negatywnie oddziałuje na ściany komórkowe bakterii, prowadząc do ich uszkodzenia, działając tym samym synergistycznie z antybiotykami β -laktamowymi. Informacje te mogłyby mieć zastosowanie w zwalczaniu infekcji wywołanych bakteriami *S. aureus*. W nawiązaniu do tej części badań mam pytanie do Doktorantki czy dostępne są w literaturze dane na temat wpływu WPM na produkcję polisacharydów powierzchniowych, hydrofobowość i potencjał elektrokinetyczny (zeta) komórek *S. aureus* i/lub innych bakterii patogennych? Czy znane są w literaturze dane na temat wpływu WPM na strukturę i/lub własności błon komórkowych bakterii? W mojej ocenie, są to ciekawe wątki badawcze, który w przyszłości mogłyby być włączone do badań przez Doktorantkę i zespół badawczy Promotora.

W dalszych etapach pracy, mgr inż. Marta Woroszyło kontynuowała z dużą konsekwencją i determinacją badania dotyczące różnych szczepów bakterii *S. aureus*. Efektem tych działań było uzyskanie wyników, które Doktorantka wraz z pozostałymi współautorami opisała w trzeciej publikacji (**Int. J. Mol. Sci. 2021,22**), wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego. W publikacji tej zawarto wyniki dotyczące efektów działania WPM i antybiotyków β -laktamowych na szczepy MRSA i MSSA. Doktorantka przebadła łącznie 28 szczepów i wykazała, że jednoczesne zastosowanie WPM i antybiotyków β -laktamowych powodowało zintensyfikowanie działania antybiotyku, obserwowane jako zahamowanie strefy wzrostu bakterii i obniżenie wartości MIC antybiotyku. Analizy mikroskopowe z użyciem technik TEM i SEM wykazały, że oddziaływanie WPM na komórki bakterii skutkowało zmianą morfologii komórek (tj. kształtu, gęstości ściany komórkowej i kondensacji cytoplazmy). Chciałam podkreślić, iż Pani Marta Woroszyło poczyniła bardzo ciekawe i ważne obserwacje w tym temacie w kontekście przyszłych zastosowań biotechnologicznych; wykazała bowiem większą efektywność działania antybiotyków β -laktamowych w obecności WPM w stosunku do szczepów MRSA w porównaniu do efektów uzyskanych w warunkach

kontrolnych. Chciałabym zapytać Doktorantkę jakie widziałaby potencjalne zastosowania praktyczne swoich osiągnięć naukowych przedstawionych w pracy doktorskiej i które z uzyskanych przez siebie wyników uważa za najważniejsze lub najciekawsze?

Podsumowując, mgr inż. Marta Woroszyło w ramach przedstawionej pracy doktorskiej, stanowiącej cykl trzech publikacji, uzyskała bardzo dużo ciekawych i wartościowych wyników, dotyczących wpływu WPM na własności i funkcjonowanie bakterii patogennych oraz skuteczność działania różnych antybiotyków. Należy docenić ilość pracy włożonej przez mgr inż. Martę Woroszyło w uzyskanie przedstawionych wyników. Doktorantka osobiście wykonała wiele eksperymentów i analiz z użyciem licznych szczepów bakteryjnych i metod mikrobiologicznych oraz biochemicznych. Przetestowała wiele wariantów, stosując różne wartości WPM, szeroki zakres czasu ekspozycji, wiele antybiotyków o różnych mechanizmach działania, wpływ WPM na dyfuzję i działanie antybiotyków oraz określiła różne parametry funkcjonalne bakterii w tych warunkach, takie jak: kinetykę wzrostu, żywotność i aktywność metaboliczną komórek, kształt i topologię ścian bakterii patogennych. W swoich badaniach Doktorantka skupiła się głównie na modelu badawczym, jakim była Gram-dodatnia bakteria *S. aureus*. Prowadzenie badań wykorzystując tak trudny materiał biologiczny, jakim są bakterie, wymaga wykonania bardzo dużej liczby powtórzeń i przeanalizowania wielu prób, co jest zadaniem bardzo czasochłonnym. Doktorantka świetnie sobie poradziła z tym problemem, czego dowodem jest uzyskanie wyników o dużej powtarzalności (świadczą o tym niskie wartości SD) i istotności statystycznej. Dzięki staranności i dokładności prowadzonych badań, Doktorantka mogła zaobserwować różnice między testowanymi wariantami i wyciągnąć ciekawe i ważne wnioski.

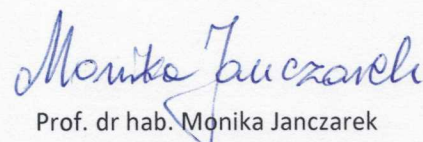
W konkluzji recenzji, chciałabym pokreślić szeroki zakres prac przeprowadzonych przez mgr inż. Martę Woroszyło, czasochłonność eksperymentów z użyciem wielu licznych preparatów mikrobiologicznych oraz testowanych wariantów. Dzięki pracowitości, wytrwałości i dużemu zaangażowaniu Doktorantka otrzymała dużą ilość interesujących i wartościowych wyników, które przyczyniły się do zwiększenia naszej wiedzy na temat mechanizmów działania WPM na bakterie patogenne oraz wpływu tego czynnika stresowego na działanie różnych związków przeciwdrobnoustrojowych. Dzięki osiągnięciom naukowym Doktorantki zastosowanie WPM może w przyszłości przyczynić się do lepszego wykorzystania antybiotyków β -laktamowych w zwalczaniu infekcji spowodowanych szczepami wielolekoopornymi.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marty Woroszyło stanowi samodzielną i wyodrębnioną część pracy zbiorowej, składającej się z trzech publikacji naukowych spójnych pod względem tematycznym oraz prowadzonych badań. Dominujący udział Doktorantki w realizacji tych zadań badawczych został potwierdzony przez Nią oraz w oświadczeniach pozostałych Współautorów publikacji. Z tych powodów, z

pełnym przekonaniem stwierdzam, że osiągnięcie naukowe Pani mgr inż. Marty Woroszyło **spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim** (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, Dz.U. z 2018 r., poz. 261, poz. 1669) przede wszystkim ze względu na: (i) aktualny problem naukowy, którego rozwiązanie jest istotne dla poprawy leczenia infekcji spowodowanych wielolekoopornymi bakteriami patogennymi, (ii) dostarczenie nowej wiedzy w temacie wpływu wirującego pola magnetycznego na morfologię i funkcjonowanie komórek bakterii patogennych, (iii) odkrycie synergistycznego działania WPM i antybiotyków β -laktamowych wobec bakterii. Doktorantka jasno i precyzyjnie określiła cel swoich badań, zoptymalizowała stosowane parametry i warunki hodowlane bakterii, precyzyjnie wykonała analizy mikrobiologiczne i biochemiczne dla ogromnej liczby próbek biologicznych i testowanych wariantów badawczych. Uważam, że Doktorantka opanowała w wymaganym zakresie warsztat badawczy niezbędny do rozwiązywania problemów naukowych w dziedzinie nauk rolniczych. Doktorantka potwierdziła swoimi osiągnięciami i aktywnością naukową, że jest przygotowana do prowadzenia wieloaspektowych zadań badawczych. W związku z powyższym, składam wnioszek do Rady Dyscypliny Naukowej „Zootechnika i Rybactwo” Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Woroszyło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na bogaty materiał analityczny zastosowany w pracy, szeroki zakres przeprowadzonych badań mikrobiologicznych i biochemicznych, ogrom włożonej pracy oraz uzyskanie przez Doktorantkę wartościowych wyników o charakterze poznawczym i aplikacyjnym, w mojej ocenie osiągnięcia zawarte w rozprawie doktorskiej należy uznać za wyróżniające się. Biorąc pod uwagę również fakt bezpośredniego zaangażowania Doktorantki w analizę i opracowanie uzyskanych danych oraz przygotowanie manuskryptów oraz opublikowania wszystkich wyników w wysokopunktowanych czasopismach o sumarycznym IF 16,947 i 380 pkt. MEiN **wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej** mgr inż. Marty Woroszyło stosowną Nagrodą przez Radę Naukową „Zootechnika i Rybactwo” Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.


Prof. dr hab. Monika Janczarek

UCHWAŁA NR 38
Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 29 listopada 2023 r.

w sprawie nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo
mgr inż. Marcie Woroszyło

Na podstawie art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.) oraz § 1 ust. 1 pkt 2) uchwały nr 130 Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 29 maja 2023 r. w związku z § 96 ust. 8 Statutu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo uchwala co następuje:

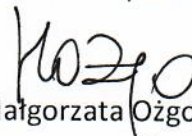
§1

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie po zapoznaniu się z przebiegiem przewodu doktorskiego postanawia nadać stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo mgr inż. Marcie Woroszyło.

§2

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodnicząca Rady Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo


dr hab. inż. Małgorzata Ożgo, prof. ZUT

Szczecin, dnia 29 listopada 2023 r.