

Streszczenie

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie i charakterystyka materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych.

Celuloza bakteryjna (BC, ang. *bacterial cellulose*), zwana też bionanocelulozą, to polimer o unikalnych właściwościach, dzięki którym znajduje on zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu i dziedzinach nauki. Podczas prowadzenia badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, do biosyntezy BC wykorzystano szczep referencyjny *Komagataeibacter xylinus* (ATCC 53524), a proces wytwarzania BC prowadzono w warunkach stacjonarnych. W celu uzyskania materiału o polepszonych właściwościach fizykochemicznych, opracowano metodę modyfikacji polegającą na przeprowadzeniu reakcji krzyżowego sieciowania BC w obecności kwasu cytrynowego jako czynnika sieciującego oraz katalizatorów – wodorofosforanu disodu, wodorowęglanu sodu, wodorowęglanu amonu i ich mieszanin. Ustalono, że w wyniku przeprowadzonej reakcji, włókna BC nie zapadały się podczas dehydratacji, dzięki czemu otrzymywano bionanomateriały o trójwymiarowej, warstwowej strukturze z licznymi przestrzeniami powietrznymi, która odróżniała je od suchej, niemodyfikowanej BC występującej w postaci cienkiej folii. Analizy parametrów fizykochemicznych modyfikowanej BC wykazały, że charakteryzuje się ona znaczną poprawą właściwości związanych z chłonnością i utrzymaniem wody w porównaniu do niemodyfikowanej, suchej BC, ale również do specjalistycznych, wysokochłonnych opatrunków komercyjnych. Dodatkowo, modyfikowana BC nie wykazywała cytotoksyczności względem komórek fibroblastów, co sugeruje, że może być ona z powodzeniem stosowana w aplikacjach biomedycznych.

Udowodniono, że materiały na bazie modyfikowanej BC, funkcjonalizowane poprzez impregnację antyseptykiem na bazie dichlorowodoru oktenidyny (OCT), stanowią doskonałe materiały opatrunkowe o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwbiofilmowej. Materiały te, dzięki swojej strukturze charakteryzowały się wydłużonym uwalnianiem OCT, wysoką zdolnością pochłaniania wysięku, dobrym przyleganiem do zakrzywionych powierzchni oraz możliwością długiego przechowywania w stanie suchym, łącząc w sobie zalety suchej i mokrej BC.

Ponadto wykazano, że aktywność OCT uwalnianego z nośnika na bazie BC może być wzmacniana przez działanie wirującego pola magnetycznego (RMF, ang. *rotating magnetic field*), dzięki wpływowi RMF na proces uwalniania i penetracji OCT przez warstwy biofilmu. W tym kontekście wykazano również, że RMF zaburza morfologię komórek tworzących biofilm oraz powoduje zmiany w macierzy biofilmowej, w tym w jej porowatości i składzie chemicznym. Ustalono także, że RMF przy niskim stężeniu OCT i krótkim czasie kontaktu nośnika z biofilmem, umożliwia uzyskanie istotnego obniżenia żywotności komórek bakteryjnych. Z tego względu, połączenie BC impregnowanej substancjami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym z czynnikami fizycznymi umożliwiającymi ich kontrolowane uwalnianie może być szczególnie obiecujące w eradykacji biofilmów zwłaszcza w trudnodostępnych miejscach rany.

Biorąc pod uwagę, że możliwości szerokiego stosowania BC są ciągle istotnie ograniczone ze względu na wysokie koszty pożywki wykorzystywanej do jej produkcji, w ramach prowadzonych badań opracowano i przeanalizowano możliwości wykorzystania pożywki produkcyjnej na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków, odpadu przemysłu skrobiowego. Jak ustalono, ze względu na wartość odżywczą soku ziemniaczanego, pożywka ta nie wymagała dodatkowej obróbki wstępnej ani suplementacji. Wydajność biosyntezy BC w pożywce na bazie soku z bulw ziemniaków była porównywalna do procesu, w którym

zastosowano standardową pożywkę Hestrin-Schramm (H-S). Wykazano także, że BC wytwarzana z użyciem pożywki na bazie soku ziemniaczanego, nie różniła się pod względem struktury, parametrów fizykochemicznych oraz składu chemicznego od BC wytworzonej z wykorzystaniem pożywki H-S.

07.10.2022

Daria Ciecholewska-Jusko

Abstract

The main objective of the doctoral dissertation was to develop and analyze the effectiveness of bacterial cellulose (BC) bionanomaterials in preventing microbial colonization and eradicating biofilms of pathogenic microorganisms.

Bacterial cellulose (BC), also known as bionanocellulose, is a polymer with unique properties, used in many industries and fields of science. During the research, the reference strain of *Komagataeibacter xylinus* (ATCC 53524) was used for the biosynthesis of BC. The production process was carried out under stationary conditions. In order to obtain a modified BC with improved physicochemical properties, a cross-linking reaction method was developed, with the use of citric acid as a cross-linking agent and disodium phosphate, sodium bicarbonate, ammonium bicarbonate, and their mixtures as catalysts. As a result of the reaction, BC fibers did not collapse during dehydration, which allowed for obtaining bionanomaterials with a three-dimensional layered structure and numerous air spaces distinguishing them from dry, unmodified BC. Furthermore, analyses of the physicochemical parameters of the modified BC showed that this material was characterized by a significant improvement in the properties related to water absorption and retention compared to unmodified, dry BC, but also to specialized, highly-absorbing commercial dressings. In addition, the modified BC showed no cytotoxicity to fibroblast cells, which suggests that it can be successfully used in biomedical applications.

It was proven that modified BC materials functionalized by impregnation with an antiseptic based on octenidine dihydrochloride (OCT) are excellent dressing materials with high antimicrobial and anti-biofilm activity. Thanks to their structure, these materials were characterized by the prolonged release of OCT, increased ability to absorb exudate, good adhesion to the curved surfaces, and the possibility of long-term dry storage, combining the advantages of dry and wet BC.

Moreover, it was shown that the antimicrobial effect of OCT released from the BC-based carrier could be enhanced by the action of a rotating magnetic field (RMF), which influences the process of OCT release and penetration through subsequent biofilm layers. In addition, it was demonstrated that RMF affects the biofilm-forming cells by disturbing their morphology and changing the porosity and composition of the extracellular matrix. It was found that the RMF, at a low concentration of OCT and a short contact time of the OCT-impregnated carrier with biofilm, allows for a significant reduction in the viability of biofilm-forming cells. Therefore, combining BCs impregnated with antimicrobial substances with physical agents enabling their controlled release may be particularly promising in biofilm eradication, especially in hard-to-reach wound sites.

The widespread use of the BC is limited because of the high cost of ingredients used for the production medium. Therefore, the research also included the development of a new culture medium based on potato tuber juice, a significant waste of the starch industry. Due to the nutritional value of the potato juice, the obtained medium did not require any pre-treatment or supplementation. The BC synthesis efficiency using the potato juice medium was comparable to the process with a standard Hestrin-Schramm (H-S) medium. It was also shown that there were no differences in the structure, physicochemical parameters, and chemical composition between the BC synthesized with the potato juice and conventional H-S media.

07.10.2022

Daria Ciecholewska-Jusko

Bydgoszcz, 10 stycznia 2023

Dr hab. inż. Aleksandra Dunisławska, prof. PBŚ
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Politechnika Bydgoska im. J. J. Śniadeckich

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko

pt. „Opracowanie i charakterystyka materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych”

Podstawą przygotowania recenzji jest pismo dr hab. inż. Arkadiusza Pietruszki, prof. ZUT - Dziekana Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 10. listopada 2021 roku (WBiHZ/160/2022).

Praca doktorska Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod kierunkiem dr hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska składa się z czterech opublikowanych i powiązanych ze sobą tematycznie artykułów naukowych, które ukazały się w latach 2021-2022. Wszystkie prace cyklu publikacyjnego stanowią oryginalne prace twórcze opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a tym samym przeszły staranną weryfikację redakcyjną – formalną oraz merytoryczną. Łączna wartość wskaźnika **Impact Factor** prac przedstawionych w cyklu wynosi **25,099**, a **liczba punktów zgodnie z wykazem czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki** za rok ukazania się wynosi **520**. We wszystkich pracach

Doktorantka jest pierwszym autorem. Deklarowany wkład Pani mgr inż. Ciecholewskiej-Juško w powstanie prac jest wiodący, a na podkreślenie zasługuje udział Doktorantki w opracowaniu koncepcji oraz metodyk badawczych, udział we wszystkich etapach eksperymentu, a także przygotowaniu manuskryptu. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej oraz samodzielności w organizacji warsztatu badawczego.

Oceny dokonano na podstawie egzemplarza rozprawy doktorskiej z załączonymi czterema bogatoilustrowanymi anglojęzycznymi kopiami artykułów naukowych, będącymi podstawą ocenianej pracy. Rozprawa składa się z autoreferatu stanowiącego syntezę wyżej wspomnianych publikacji oraz z załączników. Na autoreferat składają się 44 strony, podzielone na 8 rozdziałów: wprowadzenie, hipotezy, cel badawczy, materiały i metody badawcze, wyniki wniosków, literatura oraz omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juško stanowi oryginalne rozwiązanie w zakresie opracowania i charakterystyki materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych. Jak powszechnie wiadomo biofilm, czyli zbiór drobnoustrojów charakteryzuje się dużą odpornością na działania zwalczające, co stanowi ogromny problem w procesie leczenia ran zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej. Przez ograniczoną podatność na traktowanie bakteriobójcze oraz dużą lekooporność jego zwalczanie jest procesem trudnym i uciążliwym. Rutynowo stosowane terapie łączone zwalczania biofilmu przez chirurgiczne opracowywanie rany oraz stosowanie antybiotykoterapii są długotrwałe oraz zagrażające życiu pacjentów. Opracowanie nowych materiałów zwalczania biofilmów oraz naturalnych terapii przeciwbiofilmowych stanowi ogromne wyzwanie na współczesnej nauce. Jest to proces karkołomny z uwagi na samą specyfikę zbiorowiska bakteryjnego, ale i również na konieczność stosowania odpowiednich substancji i materiałów z uwagi na bliski kontakt ze skórą i krwią pacjenta. Jednym ze stosowanych materiałów w tym celu jest celuloza bakteryjna z uwagi na swoje specyficzne właściwości oraz strukturę. W celu zwiększenia jej potencjału realizowany jest szereg badań w zakresie modyfikacji zarówno *in situ*, jak i *ex situ*. Istotny parametr stanowi również możliwość kontrolowanego uwalniania substancji przeciwdrobnoustrojowych do rany. Dzięki stosunkowo prostemu procesowi wytwarzania i oczyszczania, a także możliwości wprowadzania modyfikacji, celuloza bakteryjna jest szczególnie obiecującym nanomateriałem w kontekście produktów opatrunkowych oraz procesu gojenia ran. Największe wyzwanie stanowią

jednak koszty produkcji, które związane są z przede wszystkim ze składnikami pożywki produkcyjnej.

Doktorantka w swojej pracy postawiła siedem hipotez, a podstawowym celem podjętych działań badawczych było opracowanie materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz eradykacji biofilmów bakteryjnych.

Celem badań opisanych w **publikacji nr 1** było dobranie katalizatorów reakcji krzyżowego sieciowania, które podczas rozkładu termicznego i w reakcjach z kwasami wydzielają duże ilości nieszkodliwych gazów, a także modyfikacja metody modyfikacji celulozy bakteryjnej za pomocą reakcji krzyżowego sieciowania w celu uzyskania materiałów charakteryzujących się zwiększoną zdolnością do pochłaniania i utrzymania cieczy przy jednoczesnym zachowaniu nietoksyczności. Doktorantka w wyżej wymienionej pracy stawia sobie za wyzwanie opracowanie metody modyfikacji, pozwalającej na połączenie korzyści ze stosowania mokrej i suchej celulozy bakteryjnej. W tym celu zastosowano reakcję krzyżowego sieciowania w wysokiej temperaturze przy optymalizacji procesu z wykorzystaniem siedmiu różnych katalizatorów. Otrzymane wyniki sugerują, że opracowana metoda modyfikacji celulozy bakteryjnej może przyczynić się do rozwoju wysokochłonnych materiałów opatrunkowych. Ogromny potencjał aplikacyjny otrzymanych wyników potwierdza również patent, którego pierwszym autorem jest Doktorantka.

Główny cel **publikacji nr 2** stanowiła ocena możliwości zastosowania soku komórkowego z bulw ziemniaka jako pełnowartościowej pożywki produkcyjnej do wytwarzania celulozy bakteryjnej. Takie rozwiązanie mogłoby ograniczyć kosztochłonność produkcji celulozy. W toku badań opracowano pożywkę produkcyjną, a także przeprowadzono proces optymalizacji z uwzględnieniem otrzymania jak największej ilości celulozy bakteryjnej. Otrzymana pożywka na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaka została scharakteryzowana pod względem zawartości cukrów, białek oraz pozostałości skrobi. Warto podkreślić, iż Doktorantka w celu wykazania ekonomicznych korzyści zastosowania takiego rozwiązania przeprowadziła kalkulację, wykazując ogromną różnicę w cenie względem komercyjnie dostępnych pożywek. Wykonane badania pozwoliły uznać, iż sok komórkowy z bulw ziemniaka stanowi odpowiednie źródło składników odżywczych dla bakterii, które syntetyzują celulozę, wpływając na wydajniejszy proces jej produkcji. Również i w przypadku wyżej wspomnianych wyników powstało zgłoszenie patentowe, w którym Doktorantka jest pierwszą autorką.

Celem **publikacji nr 3** była ocena zdolności do pochłaniania sztucznego wysięku przez materiały na bazie celulozy bakteryjnej wytworzonej w odpowiednio modyfikowanej pożywce

z soku komórkowego z bulw ziemniaków, a także ocena kinetyki uwalniania antyseptyku oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowych wyżej wspomnianego materiału. Doktorantka potwierdziła użyteczność celulozy bakteryjnej modyfikowanej za pomocą krzyżowego sieciowania, wytworzonej z użyciem pożywki opracowanej w publikacji nr 2 oraz impregnowanej o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Badanie te ukierunkowane były na testowanie potencjalnego materiału opatrunkowego skierowanego przeciwko biofilmom bakteryjnym patogenów oportunistycznym występującym w zakażeniach ran.

Cel **publikacji nr 4** to ocena wpływu wirującego pola magnetycznego na stopień uwalniania antyseptyku z nośnika na bazie celulozy bakteryjnej, a także ocena *in vitro*. Istotą tych badań jest poszukiwanie metod pozwalających sterować procesami zachodzącymi w trakcie stosowania opatrunków przeciwbiofilmowych. Doktorantka dowiodła, że zastosowanie biomateriałów na bazie celulozy bakteryjnej z zastosowaniem impregnowania i wirującego pola magnetycznego może być szczególnie skuteczne w eliminacji biofilmów zlokalizowanych w trudnodostępnych rejonach ran.

Wszystkie uzyskane wyniki zaprezentowano w logicznej kolejności oraz zostały one szczegółowo omówione. Tytuł rozprawy odzwierciedla zagadnienia poruszane w recenzowanym opracowaniu. Informacje zawarte w rozprawie doktorskiej zostały poparte licznym i właściwie dobranym piśmiennictwem świadczącym o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Praca napisana jest poprawnym stylistycznie językiem, a także w sposób zrozumiały i staranny. Z ciekawości własnej, jak i z obowiązków recenzenta chciałabym zapytać o gotowość technologiczną przedstawionych rozwiązań w zakresie opracowywania materiałów bionanocelulozowych oraz możliwości i kierunki dalszej pracy nad tym niezwykle interesującym zagadnieniem.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Za najważniejszy merytoryczny aspekt pracy można uznać skuteczne poszukiwanie nowych alternatywnych metod pozyskiwania celulozy bakteryjnej do zwalczania biofilmów i opracowania materiałów opatrunkowych w procesie leczenia ran. Należy tu jednoznacznie podkreślić wysoki stopień innowacji z uwagi na przygotowane zgłoszenia patentowe. Na uwagę zasługuje również fakt, że badania Doktorantki wykonane zostały w ramach współpracy interdyscyplinarnej z wieloma naukowcami z różnych dziedzin, a część z nich powstała w ramach realizacji projektu OPUS finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Do pracy dołączono również syntezę pozostałych osiągnięć naukowych Doktorantki z której wnioskować można, iż Pani mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko jest dobrze ukierunkowanym naukowcem. Na uwagę zasługuje spójność tematyczna zadań badawczych oraz konsekwencja w ich realizowaniu. O dużym zaangażowaniu w naukę świadczy imponujący dorobek Doktorantki na który składają się publikacje naukowe o wartości współczynnika Impact Factor równego 63,089, a także 1550 punktów MEiN, jeden patent i trzy zgłoszenia patentowe, udział w trzech projektach naukowych jako wykonawca, a także uczestnictwo w licznych konferencjach naukowych.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano wartościowe wyniki, a także przeprowadzono wnikliwą i rzeczową dyskusję. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska tworzy odpowiednio zaprojektowaną oraz kompleksowo zrealizowaną pracę badawczą. Poruszony problem badawczy jest niezwykle istotny zarówno w aspekcie zdrowia ludzi, jak i zwierząt. Opublikowane artykuły naukowe posiadają bardzo dużą wartość poznawczą, a także szeroki zakres wykonanych badań. Wszystkie publikacje naukowe stanowiące fundament niniejszej pracy są mocno osadzone w literaturze światowej o czym świadczy ich wysoki współczynnik wpływu. Czasopisma w których się ukazały doceniane są również na arenie krajowej, co ma swoje odzwierciedlenie w punktacji przyznanej przez Ministerstwo Edukacji i Nauki.

W świetle przytoczonych argumentów stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. **„Opracowanie i charakterystyka materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych”** spełnia wymagania stawianym rozprawom doktorskim zgodnie z *Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14. marca 2003 roku (Dz.U. z 2017r., poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179, ust. 1 Ustawy z dnia 3. lipca 2018 roku przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669 ze zm.), dlatego też wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie z uwagi na wskazane w tej recenzji walory rozprawy doktorskiej, wnioskuję do Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko.

Olsztyn, dnia 3 stycznia 2023 roku

Dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni
Katedra Mikrobiologii i Mykologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 1A
10-719 Olsztyn

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Darii Cicholewskiej-Juśko
pt. „Opracowanie i charakterystyka materiałów bionanocelulozowych do
zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji
biofilmów bakteryjnych”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Darii Cicholewskiej-Juśko pt. „Opracowanie i charakterystyka materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych” została wykonana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod opieką naukową Pana dra hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT. Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo z dnia 10 listopada 2022 roku Pana dra hab. inż. Arkadiusza Pietruszki, prof. ZUT, Dziekana Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (pismo nr L.dz: WBiHZ/160/2022).

1. Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl czterech, spójnych tematycznie artykułów opublikowanych w latach 2021 i 2022 w renomowanych czasopismach naukowych z zakresu biotechnologii oraz mikrobiologii indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports*:

1. **Ciecholewska-Juśko, D.**, Żywicka, A., Junka, A., Drozd, R., Sobolewski, P., Migdał, P., Kowalska, U., Toporkiewicz, M., Fijałkowski, K. (2021). Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117247.
2. **Ciecholewska-Juśko, D.**, Broda, M., Żywicka, A., Styburski, D., Sobolewski, P., Gorący, K., Migdał, P., Junka, A., Fijałkowski, K. (2021). Potato juice, a starch industry waste, as a cost-effective medium for the biosynthesis of bacterial cellulose. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10807.

3. **Ciecholewska-Juśko, D.**, Junka, A., Fijałkowski, K. (2022). The crosslinked bacterial cellulose impregnated with octenidine dihydrochloride-based antiseptic as an antibacterial dressing material for highly-exuding, infected wounds. *Microbiological Research*, 263, 127125.
4. **Ciecholewska-Juśko, D.**, Żywicka, A., Junka, A., Woroszyło, M., Wardach, M., Chodaczek, G., Szymczyk-Ziółkowska, P., Migdał, P., Fijałkowski, K. (2022). The effects of rotating magnetic field and antiseptic on in vitro pathogenic biofilm and its milieu. *Scientific reports*, 12(1), 1-19.

Liczba punktów za publikacje stanowiące rozprawę doktorską (według Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 1 grudnia 2021r.) wynosi 520, natomiast Impact Factor (IF) wynosi 25,099. Powyższe parametry naukometryczne świadczą o wysokiej wartości naukowej przedłożonej do oceny dysertacji.

Oryginalne prace badawcze składające się na rozprawę zostały opatrzone 44-stronicowym omówieniem zawierającym: streszczenie (w języku polskim oraz angielskim), wprowadzenie, hipotezy oraz cel pracy, krótki opis stosowanych metod i uzyskanych wyników, wnioski jak również bibliografię wykorzystaną do przygotowania wyżej wymienionego omówienia i opis dorobku naukowego Doktorantki. Ponadto, do pracy dołączono oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opisujące ich udział w powstanie wyżej wymienionego cyklu publikacji. Z dołączonych do dysertacji oświadczeń wynika, że Doktorantka brała udział w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, poddała analizie i zinterpretowała uzyskane wyniki oraz przygotowała manuskrypty. We wszystkich publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia Pani mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko jest pierwszym autorem co świadczy o jej wiodącej roli w ich powstanie.

2. Ocena zasadności wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Doktorantka podjęła się trudnej tematyki związanej z opracowaniem oraz charakterystyką materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych. Zakażenia ran przewlekłych stanowią poważny i narastający problem współczesnej medycyny. Mogą się one pojawić na każdym etapie procesu gojenia spowalniając ten proces oraz stając się zagrożeniem dla życia pacjenta. Środowisko ran przewlekłych jest bogate w składniki odżywcze stanowiąc tym samym idealne warunki dla rozwoju mikroorganizmów posiadających zdolność tworzenia biofilmu. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się opracowaniu innowacyjnych terapii przeciwdrobnoustrojowych, które nie tylko mogą pozytywnie wpłynąć na proces rekonwalescencji pacjentów, ale również mogą przyczynić się do obniżenia kosztów związanych z opieką medyczną. Szczególnie ważne są badania zmierzające do opracowania nowoczesnych opatrunków przeciwdrobnoustrojowych, które w znacznym stopniu ograniczą adhezję drobnoustrojów i obniżą ich liczebność w ranie do bezpiecznego poziomu. Celuloza bakteryjna (BC) ze względu na unikalne właściwości jest atrakcyjnym biopolimerem do zastosowań w aplikacjach medycznych, jednakże potencjał tego innowacyjnego materiału nie

jest w pełni wykorzystany. Ze względu na fakt, że BC jest dobrym bionośnikiem substancji czynnych może być stosowana jako materiał opatrunkowy na przewlekłe rany. Tematyka przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest więc związana z niezwykle ważnym zagadnieniem poszukiwania nowatorskiej metody leczenia przewlekłych ran zainfekowanych przez mikroorganizmy tworzące biofilm. Problematyka pracy doktorskiej jest nowatorska, a jej realizacja poszerzyła dotychczasową wiedzę z zakresu opracowania nowoczesnych opatrunków oraz stanowi rozwiązanie oryginalnego problemu badawczego. Postawiony cel naukowy jest aktualny i odpowiada poziomowi jakim powinna odznaczać się rozprawa doktorska.

3. Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią wartościowe uzupełnienie prac badawczych prowadzonych przez Zespół dra hab. inż. Karola Fijałkowskiego, prof. ZUT oraz innych badaczy. W celu weryfikacji prawidłowo sformułowanych hipotez oraz celu rozprawy Pani mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko przeprowadziła szereg eksperymentów stosując szeroki zakres metod badawczych, dzięki czemu otrzymane wyniki i wnioski są jak najbardziej przekonujące, a ich dobór świadczy o niezwyklej rzetelności Doktorantki.

Publikacja 1: *Ciecholewska-Juśko, D., Żywicka, A., Junka, A., Drozd, R., Sobolewski, P., Migdał, P., Kowalska, U., Toporkiewicz, M., Fijałkowski, K. (2021). Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. Carbohydrate Polymers, 253, 117247.*

W pierwszej pracy składającej się na rozprawę doktorską, mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko opracowała oraz zoptymalizowała proces modyfikacji celulozy bakteryjnej w wyniku reakcji krzyżowego sieciowania oraz różnych wariantów katalizatorów w celu poprawy zdolności sorpcyjnych tego biomateriału w stanie suchym. Etap ten był ważny, z uwagi na fakt, że odpowiednie właściwości absorpcji i utrzymania cieczy determinują zastosowanie materiału jako nośnika dla związków przeciwdrobnoustrojowych. Wyniki badań potwierdziły wyższe współczynniki pęcznienia oraz utrzymania wody BC po modyfikacji, niezależnie od zastosowanego wariantu eksperymentalnego, w porównaniu z niemodyfikowaną BC. Co najważniejsze, Doktorantka porównała chłonność otrzymanych materiałów z komercyjnie dostępnymi opatrunkami stosowanymi na rany z dużym wysiękiem wykazując wyższą powierzchnię wodną modyfikowanej BC aniżeli opatrunków dostępnych na rynku. Jednakże, w rozdziale „Materiały i metody” brakuje informacji o nazwach oraz firmie produkującej testowane opatrunki. Czy produkty te były badane pod względem ich właściwości mechanicznych, cytotoksyczności czy też aktywności przeciwdrobnoustrojowej? Czy parametry te były porównywalne do tych wykazanych w toku badań nad celulozą bakteryjną stosowaną przez Doktorantkę? Dodatkowo, chciałabym prosić o uzupełnienie informacji dotyczących sposobu konserwacji szczepu produkującego BC należącego do gatunku *Komagataeibacter xylinus* zakupionego z Amerykańskiej Kolekcji Mikroorganizmów. Czy przed przeprowadzeniem hodowli produkcyjnej została przeprowadzona hodowla inokulacyjna? Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka wybierając stężenia czynnika sieciującego oraz katalizatora? Doktorantka wykazała również obecność śladowych stężeń sodu lub fosforu na modyfikowanej celulozie bakteryjnej, a wartości te różniły się w zależności od zastosowanego

wariantu eksperymentalnego. Czy pierwiastki te mogły mieć wpływ na analizowane właściwości sorpcyjne oraz otrzymane wyniki cytotoksyczności?

Publikacja 2: Ciecholewska-Juśko, D., Broda, M., Żywicka, A., Styburski, D., Sobolewski, P., Gorący, K., Migdał, P., Junka, A., Fijałkowski, K. (2021). *Potato juice, a starch industry waste, as a cost-effective medium for the biosynthesis of bacterial cellulose. International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10807.

W drugiej publikacji składającej się na rozprawę doktorską, mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko, opracowała pożywkę produkcyjną na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków jako jedyne źródła składników odżywczych w hodowli *K. xylinus*. Zastosowanie powyższego medium hodowlanego było uzasadnione z ekonomicznego oraz ekologicznego punktu widzenia. Otrzymane wyniki potwierdziły, że wydajność produkcji BC była zależna od zastosowanego szczepu *K. xylinus*, w przypadku 4 szczepów opracowana pożywka nie zapewniała optymalnej wydajności produkcji celulozy bakteryjnej. W badaniach własnych Doktorantka zastosowała odmianę ziemniaka „Tajfun”. Czy w opinii Doktorantki odmiana ziemniaka może mieć wpływ na stężenie oraz właściwości otrzymanego BC? Ponadto, aby oszacować korzyści ekonomiczne wynikające z zastosowania pożywki z bulw ziemniaków Doktorantka przeprowadziła próbę kalkulacji zakładającą zastosowanie ww. medium hodowlanego jako surowca do produkcji BC. Czy Doktorantka mogłaby podjąć próbę oszacowania kosztu celulozy bakteryjnej (bioproduktu końcowego) otrzymanej na pożywce na bazie soku komórkowego z bulw ziemniaków? Dodatkowo, Doktorantka wskazała na możliwość pozyskania soku komórkowego z ziemniaków będących odpadami przemysłu skrobiowego. Czy w opinii Doktorantki pożywka taka charakteryzowałaby się takimi samymi parametrami składników odżywczych w porównaniu z czystym wariantem? Czy odpad ten nie będzie cechował się obecnością trudnych do usunięcia cząstek stałych, które negatywnie wpłynęłyby na proces oczyszczania BC, a w konsekwencji limitowałyby jej praktyczne zastosowanie? W powyższej publikacji Doktorantka opisała również wyniki analiz aktywności przeciwdrobnoustrojowej BC otrzymanej zarówno z hodowli z pożywką odpadową jak również tej uzyskanej w pożywce Hestrin-Schramm. W tym celu wysycono nanomateriały 1 mL antyseptyku na bazie dichlorowodoru oktenidyny dostępnego komercyjnie. Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka wybierając powyższą objętość antyseptyku?

Publikacja 3: Ciecholewska-Juśko, D., Junka, A., Fijałkowski, K. (2022). *The crosslinked bacterial cellulose impregnated with octenidine dihydrochloride-based antiseptic as an antibacterial dressing material for highly-exuding, infected wounds. Microbiological Research*, 263, 127125.

W trzeciej publikacji składającej się na rozprawę doktorską, mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko, oszacowała potencjał BC jako materiału opatrunkowego skierowanego przeciwko biofilmom tworzonym przez *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) oraz *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15542). Ponadto aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanego materiału badano względem klinicznych izolatów gronkowców należących do gatunków *S. aureus*, *S. equorum*, *S. warneri*, *S. xylosus*, a także do gatunku *P. aeruginosa*. Izolaty kliniczne pochodziły z kolekcji mikroorganizmów Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii ZUT. Z uwagi na fakt, że bakterie nabywają oporności na antybiotyki, stosowanie środków antyseptycznych stało się powszechne w terapii i profilaktyce miejscowych zakażeń związanych z biofilmem.

Dlatego też nasuwa się pytanie czy izolaty kliniczne wykorzystane w badaniach charakteryzowały się opornością na antybiotyki? Dodatkowo na szczególne uznanie zasługuje opracowanie przez Doktorantkę modelu łożyska rany, co wciąż stanowi duże wyzwanie dla badaczy.

Publikacja 4: Ciecholewska-Juśko, D., Żywicka, A., Junka, A., Woroszyło, M., Wardach, M., Chodaczek, G., Szymczyk-Ziółkowska, P., Migdał, P., Fijałkowski, K. (2022). *The effects of rotating magnetic field and antiseptic on in vitro pathogenic biofilm and its milieu. Scientific reports*, 12(1), 1-19.

W czwartej publikacji składającej się na rozprawę doktorską, mgr inż. Daria Ciecholewska-Juśko, podjęła próbę analizy wpływu wirującego pola magnetycznego (RMF) na uwalnianie antyseptyku z nośnika na bazie suchej, niemodyfikowanej BC i jego penetrację przez warstwy biofilmu tworzonego przez *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) oraz *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15542). Przeprowadzenie tego etapu badawczego jest uzasadnione, z uwagi na zdolność biofilmu do odbudowania struktury w krótkim czasie nawet po procesie konwencjonalnego leczenia. Otrzymane wyniki potwierdziły wzrost stopnia uwalniania zastosowanego antyseptyku na bazie OCT oraz jego penetracji przez kolejne warstwy badanego biofilmu pod wpływem RMF. Jednakże, brakuje informacji na temat sposobu przechowywania szczepów stosowanych do przygotowania biofilmów? Czy metoda konserwacji szczepów ma wpływ na ewentualną utratę przez nie cech związanych z wirulencją?

Wyniki badań prezentowanych w powyższych pracach eksperymentalnych można zaliczyć do badań podstawowych, niemniej jednak mają one przede wszystkim wymiar aplikacyjny z potencjałem do wykorzystania w przyszłości w praktyce. Dane przedstawione w tych publikacjach mają charakter nowatorski. Przedłożone do oceny prace stanowią logiczną całość, ich cele badawcze zostały jasno sprecyzowane, analiza otrzymanych wyników jest satysfakcjonująca, a dyskusja została przeprowadzona w sposób prawidłowy.

W skład przedłożonej rozprawy doktorskiej, oprócz kopii publikacji, wchodzi również manuskrypt będący autorskim opracowaniem Doktorantki. W rozdziale „Wprowadzenie” Doktorantka w sposób przekonujący uzasadniła celowość podjęcia tematyki badawczej. W bardzo oszczędny sposób opisała dotychczasowy stan wiedzy z zakresu problematyki dysertacji, co budzi mój niedosyt. W moim odczuciu brakuje informacji o szlakach metabolicznych zaangażowanych w proces produkcji BC. Informacja ta jest ważna, z uwagi na fakt stosowania przez Doktorantkę różnych pożywek produkcyjnych: pożywka z soku komórkowego bulw ziemniaka oraz podłoże Hestrin-Schramm. W kolejnych rozdziałach precyzyjnie sformułowano hipotezy badawcze oraz postawiono cel rozprawy wraz z celami szczegółowymi. Jednakże, rozdział „Materiały i metody badawcze” został skrótowo opisany. Brakuje informacji dotyczących między innymi: sposobu konserwacji stosowanych szczepów, badania czystości hodowli podczas prowadzonych procesów, liczby powtórzeń biologicznych, danych dotyczących gęstości optycznej/liczby komórek *S. aureus* oraz *P. aeruginosa* stosowanych w analizach żywotności bakterii, stężenia roztworów OCT do impregnacji BC. Dodatkowo nieprecyzyjnie nazwano zastosowany antyseptyk – poprawniej byłoby zamiast „antyseptyk dichlorowodorek oktenidyny”, „antyseptyk na bazie dichlorowodoru oktenidyny”, jest to produkt dostępny komercyjnie, który oprócz wspomnianego związku zawiera w składzie inne substancje. Rozdział „Wyniki” został bardzo dobrze opracowany,

czytelnie opisano poszczególne etapy badawcze oraz otrzymane wyniki. Opisując Etap 2 prac eksperymentalnych Doktorantka wspomniała o badaniu 25 odmian ziemniaków jako potencjalnych surowców do przygotowania pożywki produkcyjnej do wytwarzania BC z wykorzystaniem różnych szczepów *K. xylinus* i różnych warunków hodowli. Jednakże, w publikacji D-2 nie ma opisu tej części prac badawczych, Doktorantka napisała, że wykorzystwała jedynie odmianę ziemniaka „Tajfun” jako pożywkę produkcyjną. Z czego wynika ta rozbieżność? Opracowanie zamyka rozdział „Wnioski”, który potwierdza, że postawione cele pracy zostały zrealizowane i stanowią istotny wkład w poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat możliwości zastosowania materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych.

4. Podsumowanie i konkluzja końcowa

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko uważam, że uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i wartościowe. Stanowią one nie tylko wartość poznawczą, ale są również podstawą do planowania i prowadzenia dalszych doświadczeń naukowych. Przedstawione, powyższe spostrzeżenia nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej. Pytania opisane powyżej, które nasunęły mi się po lekturze manuskryptu będącego autorskim opracowaniem Doktorantki oraz publikacji wchodzących w skład rozprawy wydają się być dobrym punktem do rozpoczęcia dyskusji podczas obrony dysertacji.

Chciałabym podkreślić, że jestem pod dużym wrażeniem dorobku naukowego Doktorantki obejmującego liczne publikacje naukowe, doniesienia konferencyjne, patent oraz zgłoszenia patentowe, udział w projektach badawczych. Bez wątpienia jest ona zaangażowanym młodym naukowcem z dużym potencjałem badawczym. W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest dowodem dojrzałości naukowej Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko oraz Jej wyróżniającego przygotowania merytorycznego i warsztatowego.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko pt. „Opracowanie i charakterystyka materiałów bionanocelulozowych do zapobiegania kolonizacji przez drobnoustroje patogenne oraz do eradykacji biofilmów bakteryjnych” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) – zgodnie z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z powyższym, wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową oraz aplikacyjną wyników opublikowanych w prestiżowych czasopiśmie naukowych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. uczelni

UCHWAŁA NR 36
Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 13 marca 2023 r.

w sprawie nadania mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko
stopnia doktora

Na podstawie art. 179 ust. 2 i 3 pkt 2b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.) w związku z art. 14 ust. 2 pkt 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789, z późn. zm.) uchwala się, co następuje:

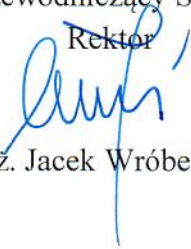
§ 1.

Senat Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie nadaje mgr inż. Darii Ciecholewskiej-Juśko stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

§ 2.

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodniczący Senatu
Rektor


dr hab. inż. Jacek Wróbel, prof. ZUT