

Toruń, 30.09.2024r.

Prof. dr hab. Patrycja Golińska
Katedra Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Recenzja

Rozprawy doktorskiej **mgr inż. Jakuba Michalskiego**

pt. „**Wykorzystanie wybranych cieczy jonowych do zwalczania lekoopornych bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa***” wykonanej na Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (UPP) pod kierunkiem dr hab. Doroty Narożnej, prof. UPP oraz dra Tomasza Cłapy.

1. Wprowadzenie

Recenzję wykonałam na zlecenie Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo UPP, prof. dr hab. Andrzeja Blecharczyka, z dnia 1 sierpnia 2024r. Otrzymałam kompletny zestaw dokumentów umożliwiający ocenę rozprawy doktorskiej zgodnie z wymaganiami określonymi w ustawie z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023r., poz. 742 ze zmianami).

2. Ocena wyboru problematyki badawczej

Wzrost oporności na antybiotyki i malejąca liczba środków przeciwdrobnoustrojowych zostały uznane za nowe zagrożenia dla zdrowia publicznego. Obecnie szczepy patogenów odporne na leki pojawiają się szybciej niż tempo odkrywania nowych leków i antybiotyków. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) do powstania oporności na antybiotyki u wielu patogenów bakteryjnych i grzybiczych doprowadziło nadmierne przepisywanie i niewłaściwe stosowanie antybiotyków. Istnieje realne ryzyko, że w niedalekiej przyszłości będzie niewiele lub nie będzie żadnej terapii antybiotykowej na mikroorganizmy odporne na leki, w szczególności wielolekooporne (MDR) Gram-ujemne patogeny, co spowoduje dalszy wzrost liczby osób umierających z powodu infekcji MDR w Unii Europejskiej, która wynosi 25000 rocznie. Według amerykańskiego Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom (CDC) 1,7 miliona pacjentów rocznie zaraża się podczas pobytu w amerykańskim szpitalu, co skutkuje 99000 (5,8%) zgonów. Pojawiają się superbakterie, które powodują infekcje trudne lub niemożliwe do wyleczenia antybiotykami, a im więcej antybiotyków stosujemy, tym szybciej zachodzi ten proces prowadząc do rozprzestrzeniania się takich bakterii. Dlatego pilnie potrzebna jest nowa generacja antybiotyków lub innych terapeutyków, aby kontrolować wielolekooporne drobnoustroje patogenne, które powodują globalny kryzys zdrowotny. Szczególne wyzwanie stanowią patogeny ESKAPE, do których należą *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp., które są odporne na wiele leków. Obecnie, wkraczając w trzecią dekadę XXI wieku, pomimo wprowadzenia kilku nowych antybiotyków i adiuwantów antybiotykowych, takich jak nowe inhibitory β -laktamazy, organizmy te nadal stanowią główne wyzwania terapeutyczne. Bakterie te mają kilka wspólnych kluczowych cech biologicznych, w tym adaptacje do przetrwania w środowisku opieki zdrowotnej, różne metody pozyskiwania

determinantów oporności i rozpowszechnianie opornych szczepów wysokiego ryzyka na całym świecie. Wraz z pojawieniem się sekwencjonowania nowej generacji, nowe narzędzia do monitorowania i zwalczania rozprzestrzeniania się tych organizmów szybko ewoluowały, a także odnowiło się zainteresowanie niekonwencjonalnymi podejściami antybiotykovymi.

W tym kontekście podjęta problematyka badawcza przez mgr inż. Jakuba Michalskiego jest nowatorska a wybór tematu rozprawy doktorskiej pt.: **Wykorzystanie wybranych cieczy jonowych do zwalczania lekoopornych bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa***” jest uzasadniony, zarówno z poznawczego, jak i użytecznego punktu widzenia, co spełnia wymagania stawione kandydatom do stopnia doktora określone w art. 187 pkt. 2 ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

3. Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Jakuba Michalskiego, przygotowana pod kierunkiem dr hab. Doroty Narożnej, prof. UPP oraz dra Tomasza Cłapy, stanowi zbiór trzech opublikowanych, powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Rozprawa doktorska liczy 119 stron i składa się z następujących rozdziałów: Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i metody, Omówienie uzyskanych wyników, Podsumowanie i wnioski oraz Literatura. Praca poprzedzona jest wykazem publikacji, wykazem skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Na końcu pracy zamieszczono oświadczenia doktoranta i współautorów publikacji oraz publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, w tym dwie prace eksperymentalne i jedna praca przeglądowa.

Publikacje obejmują kopie następujących artykułów:

1. Cłapa T, Michalski J, Syguda A, Narożna D, van Oostrum P, Reimhult E. (2021). Morpholinium-based ionic liquids show antimicrobial activity against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, ;172(3):103817. doi: 10.1016/j.resmic.2021.103817.
2. Michalski J, Odrzygóźdź C, Mester P, Narożna D, Cłapa T. (2023). Defeat undefeatable: Ionic liquids as novel antimicrobial agents. *Journal of Molecular Liquids*, 369: 120782. doi: 10.1016/j.molliq.2022.120782.
3. Michalski J, Cłapa T, Narożna D, Syguda A, van Oostrum P, Reimhult E. (2024). Morpholinium-based ionic liquids as potent antibiofilm and sensitizing agents for the control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, 436(13):168627. doi: 10.1016/j.jmb.2024.168627.

Artykuły te opublikowano w latach 2021-2024. Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor) zbioru publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 13,946, a suma punktów według MNiSW jest równa 210. Są to wskaźniki dobre. Wszystkie publikacje są wieloautorskie, liczące od 5 do 6 autorów. W dwóch publikacjach doktorant jest pierwszym autorem w jednej drugim. W żadnej z tych publikacji nie jest autorem korespondencyjnym. W oświadczeniach wszyscy autorzy określili swój udział i zakres wykonywanych prac w czasie realizacji badań i przygotowywania manuskryptów. Z oświadczeń wynika, że w pracach eksperymentalnych mgr inż. Jakub Michalski wykonał niemal wszystkie lub wszystkie eksperymenty, przeprowadził analizę danych i interpretację wyników, wykonał wykresy i figury, napisał pierwszą wersję manuskryptu, a także uczestniczył w opracowaniu końcowej wersji manuskryptu i odpowiedzi na recenzje. W ostatniej pracy w cyklu współtworzył koncepcję badań. Udział w pracy przeglądowej doktoranta polegał

na przeprowadzeniu przeglądu literaturowego, wiodącym udziale w przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, udziale w redakcji tekstu i opracowaniu końcowej wersji manuskryptu oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Na tej podstawie rolę mgr Jakuba Michalskiego w powstawaniu w/w prac uznaję za wiodącą.

Na szczególną uwagę zasługuje trzecia z wymienionych publikacji, która ukazała się w Journal of Molecular Biology wydawnictwa Elsevier (IF=4,7; MNiSW=140 pkt).

W mojej ocenie przedstawiony cykl publikacji powinien rozpoczynać się od pracy przeglądowej, która stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki badawczej. Ustawa nie nakazuje chronologicznego ułożenia prac w cyklu.

Podsumowując ocenę formalną stwierdzam, że cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe mgr inż. Jakuba Michalskiego oraz ich opis spełniają warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 pkt.3 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2023r., poz. 742 ze zmianami).

1. Ocena merytoryczna

Pierwszy z głównych rozdziałów, zatytułowany „Wprowadzenie” obejmuje 8 stron i stanowi opis tematyki przedmiotu wprowadzający czytelnika w zakres prowadzonych badań. Doktorant przedstawia zagadnienie antybiotykooporności, w tym wielolekooporności, charakteryzuje bakterie należące do gatunku *Pseudomonas aeruginosa* oraz cieczy jonowe, a szczególnie ich właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne i ich różne zastosowanie wynikające z doboru odpowiednich kationów i/lub anionów. Szczególną uwagę doktorant poświęca scharakteryzowaniu biologicznie aktywnych cieczy jonowych, zwłaszcza o działaniu przeciwbakteryjnym i mechanizmom ich działania na bakterie. Autor w tej części pracy doktorskiej przywołuje często drugą z cyklu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej i dlatego, w mojej ocenie, jak wspominałam wcześniej, powinna ona otwierać ten cykl.

W mojej ocenie zaprezentowany przegląd literatury stanowi logiczną i spójną całość. Przedstawione podstawy teoretyczne są dobrym wprowadzeniem do „celu pracy”, którym była ocena antybakteryjnego potencjału morfoliniowych cieczy jonowych na bazie herbicydów w zwalczaniu lekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, w kontekście wykorzystania tych związków jako samodzielnych środków antybakteryjnych oraz jako adiuwantów w antybiotykoterapii.

Doktorant w ramach realizacji głównego celu badawczego zaplanował pięć celów szczegółowych:

1. Charakterystyka antybakteryjnego wpływu morfoliniowych cieczy jonowych na bazie herbicydów na wzrost i przeżywalność wybranych czterech szczepów *P. aeruginosa*.
2. Ocena wpływu morfoliniowych cieczy jonowych na zjadliwość *P. aeruginosa* związaną ze zmianą poziomu syntezy niebiałkowego czynnika wirulencji, plicjaniny.
3. Określenie przeciwbiofilmowych właściwości morfoliniowych cieczy jonowych na bazie herbicydów oraz ocena ich wpływu na tworzenie i aktywność metaboliczną biofilmów pałeczki ropy błękitnej.
4. Analiza występowania efektu synergistycznego pomiędzy morfoliniowymi cieczami jonowymi na bazie herbicydów, a wybranymi antybiotykami, w zwalczaniu lekoopornych szczepów *P. aeruginosa*.
5. Ocena aktywności hemolitycznej morfoliniowych cieczy jonowych na bazie herbicydów w stosunku do ludzkich erytrocytów.

Postawione cele badawcze osiągnięto realizując zadania badawcze, jak poniżej.

1. Antybakteryjne działanie cieczy jonowych wobec *P. aeruginosa* oceniono wyznaczając MIC i MBC,
2. Wpływ wybranych cieczy jonowych na wirulencję *P. aeruginosa* zbadano oznaczając ilościowo pocijaninę metodą spektrofotometryczną.
3. Wpływ wybranych cieczy jonowych na aktywność metaboliczną i żywotność komórek *P. aeruginosa* oznaczono z wykorzystaniem testu TTC.
4. Wpływ wybranych cieczy jonowych na tworzenie biofilmu zbadano z wykorzystaniem testów z fioletem krystalicznym i TTC.
5. Wpływ wybranych cieczy jonowych w kombinacji z antybiotykami wobec *P. aeruginosa* oznaczono metodą szachownicy i wyznaczając indeks frakcyjnego stężenia hamującego.
6. Aktywność hemolityczną wybranych cieczy jonowych zbadano wykorzystując krew pełną ludzką oraz same erytrocyty.

W mojej opinii cel badań został poprawnie postawiony. Zadania badawcze zostały logicznie zaplanowane i konsekwentnie realizowane. Do realizacji postawionego celu mgr inż. Jakub Michalski wykorzystał szereg metod badawczych stosowanych w mikrobiologii i biochemii, które w sposób syntetyczny przedstawiono w rozdziale „**Materiały i metody**”. W poszczególnych artykułach naukowych w sposób szczegółowy omówiono metody i procedury przeprowadzonych badań.

Do tej części pracy mam jednak pytania/komentarze:

Zarówno w publikacjach jak i opisie w pracy doktorskiej nie zamieszczono cytowania czy też nie podano standardu według którego oznaczano MIC i/lub MBC cieczy jonowych i/lub antybiotyków. Jedną z powszechnie stosowanych metod jest np. standard CLSI, w którym MIC ocenia się wizualnie (brak zmętnienia podłoża/wzrostu bakterii w próbie), bez pomiaru OD z użyciem czytnika płytek. Co zdecydowało o wyborze metody wykorzystanej przez doktoranta?

Nie umieszczono również cytowania w przypadku metod zastosowanych do oznaczeń synergizmu cieczy jonowych i antybiotyków oraz hemolizy, zarówno w publikacjach jak i dysertacji. Jest to ważna informacja pozwalająca na weryfikację oryginalnego źródła.

W pierwszej z publikacji eksperymentalnych nie podano liczby powtórzeń zastosowanych w poszczególnych eksperymentach. W ilu powtórzeniach wykonywano poszczególne analizy/warianty analiz?

Proszę o doprecyzowanie przy jakiej długości fali dokonano pomiaru absorpcji podczas oznaczania aktywności biofilmu metodą TCC? W publikacji trzeciej podano $\lambda=490$ nm podczas gdy w dysertacji w sekcji „Materiały i metody” podano $\lambda=570$ nm.

W rozdziale „**Omówienie uzyskanych wyników**” doktorant opisuje w sposób syntetyczny rezultaty badań przedstawione w poszczególnych artykułach naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Wyniki badań zostały dobrze uzasadnione i porównane z danymi z literatury. Dyskusja wyników badań jest rzeczowym, ale też krytycznym ich omówieniem z równoczesnym wykorzystaniem w ich interpretacji wyników innych badaczy. Rozdział ten dokumentuje dojrzałość naukową doktoranta i pokazuje, że mgr inż. Jakub Michalski swobodnie porusza się w światowej literaturze dotyczącej tematyki badawczej. Doktorant zebrał bogate piśmiennictwo, w którym w mojej ocenie, znajdują się ważne publikacje dotyczące zakresu

badania doktoranta, które ukazały się w ciągu ostatnich dziesięciu lat. Zebraną literaturę umiejętnie wykorzystał.

Przeprowadzone badania zaowocowały dużą ilością wyników, które doktorant opublikował w dwóch artykułach naukowych, w międzynarodowych czasopismach, posiadających współczynnik wpływu (IF), odpowiednio 3,946 i 4,7. Wyniki w tych publikacjach są zaprezentowane w sposób czytelny i przejrzysty. Są starannie opracowane, dobrze zilustrowane i dostosowane do wymagań czasopism. Wyniki zostały poprawnie opracowane pod względem statystycznym. Doktorant udowodnił, że posiada ogólną wiedzę teoretyczną do właściwej oceny otrzymanych wyników badań. Nabył też umiejętność syntetycznego opisu problematyki badawczej zaprezentowanej w zbiorze publikacji, przedstawionych jako rozprawa doktorska. Kolejny rozdział rozprawy stanowi „**Podsumowanie i wnioski**”. Doktorant sformułował dziewięć trafnych wniosków, co potwierdza jego zdolność do syntetycznego ujęcia rezultatów pracy.

Najważniejsze osiągnięcia

Za najważniejsze rezultaty rozprawy uważam:

1. Wyselekcjonowanie spośród 12 morfoliniowych cieczy jonowych na bazie herbicydów takich o działaniu przeciwbakteryjnym, zarówno hamującym wzrost jak i bójczym wobec większości zbadanych szczepów *P. aeruginosa*.
2. Wykazanie, że przeciwbakteryjne działanie morfoliniowych cieczy jonowych zależy przede wszystkim od struktury kationu.
3. Wrażliwość szczepów *P. aeruginosa* na działanie morfoliniowych cieczy jonowych na bazie herbicydów jest szczepowo zależna.
4. Wykazanie, że morfoliniowe cieczy jonowe hamują aktywność dehydrogenaz wpływając negatywnie na aktywność metaboliczną szczepów *P. aeruginosa*, nawet jeśli nie hamowały wzrostu bakterii, zmniejszając wirulencję tych szczepów poprzez obniżenie syntezy pirocyaniny i hamować tworzenie biofilmów wytwarzanych przez te bakterie.
5. Wyselekcjonowanie cieczy jonowych i antybiotyków o synergistycznym działaniu, co umożliwia ich skuteczne zastosowanie wobec *P. aeruginosa* w obniżonych dawkach.

Morfoliniowe cieczy jonowe na bazie herbicydów, mimo że nie znajdują bezpośredniego zastosowania w terapii klinicznej, ze względu na swoją cytotoksyczność, to mogą służyć do eliminowania, na drodze dezynfekcji, patogenów *P. aeruginosa* w środowisku szpitalnym i w innych środowiskach, w tym przy produkcji żywności zwiększając jej bezpieczeństwo.

Podsumowując ocenę merytoryczną, stwierdzam, że mgr inż. Jakub Michalski uzyskał wiele cennych wyników, które wpisują się w światową dyskusję nad problemem rosnącej oporności wśród bakterii. Oceniając zbiór trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych oraz ich opis, stwierdzam, że doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, posiadał umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Publikacje oryginalne są spójne i wzajemnie się uzupełniają. Dysertację doktorską mgr Jakuba Michalskiego uważam za wartościową pracę eksperymentalną, stanowiącą oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego. Wnosi ona do nauki istotne informacje poszerzające stan

wiedzy w zakresie wykorzystania morfoliniowych cieczy jonowych na bazie herbicydów w zwalczaniu wielolekopornych szczepów *P. aeruginosa*.

Z dokumentacji dołączonej do dysertacji wynika, że doktorant wykazywał znaczącą aktywność naukową. Był współautorem dwóch publikacji niewchodzących w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę dysertacji, prezentował wyniki swoich badań na czterech konferencjach międzynarodowych i siedmiu krajowych oraz uczestniczył w dwóch zagranicznych stażach naukowych i był wykonawcą w projektach badawczych. W swoim dorobku ma również osiągnięcia organizacyjne, jak pozyskanie JuniorGrantu i dydaktyczne, prowadząc jako asystent w Katedrze Biochemii i Biotechnologii zajęcia laboratoryjne ze studentami.

Podczas czytania i analizy rozprawy nasunęły mi się pytania, które chciałabym zadać doktorantowi podczas obrony rozprawy doktorskiej.

- 1. Czy działanie cieczy jonowych na bazie herbicydów na komórki grzybów jest odmienne od tego wobec komórek bakteryjnych?**

5. Ocena końcowa

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Jakuba Michalskiego pt.: „Wykorzystanie wybranych cieczy jonowych do zwalczania lekoopornych bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2023r., poz. 742 ze zmianami).

Doktorant opanował warsztat badawczy z zakresu mikrobiologii i biochemii. Udowodnił, że potrafi rozwiązywać problemy naukowe i posiada teoretyczną wiedzę w zakresie mikrobiologii. Pokazał, że ma umiejętność opracowania, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników z wynikami dostępnymi w obszernej literaturze o zasięgu międzynarodowym. Ponadto, w cyklu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych zaprezentował bardzo dobrą znajomość problematyki badawczej, stanowiącej rozprawę doktorską. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Jakuba Michalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Patrycja Golińska