



Katowice, dn. 29 września 2024 r.

dr hab. Tomasz Płociniczak
profesor Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach
e-mail: tomasz.plociniczak@us.edu.pl
tel. +48667125783

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. JAKUBA MICHAŁSKIEGO
pt. Wykorzystanie wybranych cieczy jonowych do zwalczania lekoopornych bakterii z gatunku
Pseudomonas aeruginosa

SYLWETKA DOKTORANTA

Doktorant Jakub Filip Michalski tytuł zawodowy magistra inżyniera uzyskał 14 czerwca 2018 roku na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W czasie studiów przygotował dwie prace: inżynierską obronioną w 2017 roku oraz magisterską obronioną w roku 2018. Praca magisterska realizowana pod kierunkiem dr hab. Marka Selweta, prof. UPP zatytułowana była „Wpływ cieczy jonowych na rośliny dwuliścienne“, tak więc przystępując do realizacji pracy doktorskiej Doktorant posiadał już z pewnością przydatny zasób wiedzy i umiejętności praktycznego wykorzystania cieczy jonowych.

Z dostarczonych materiałów wynika, iż mgr inż. Jakub Michalski o stopień doktora ubiega się po raz pierwszy.



Doktorant od 2022 roku jest zatrudniony na etacie asystenta w Katedrze Biochemii i Biotechnologii, a w czasie studiów doktoranckich odbył dwa staże naukowe w ośrodkach w Stanach Zjednoczonych oraz w Austrii. W bazie Scopus na dzień 29.09.2024 r. indeksowane są 4 publikacje z Jego współautorstwem o łącznym IF zgodnym z rokiem wydania publikacji równym 18.846, a liczba punktów ministerialnych dla tych artykułów wynosi 450. Uzyskane wyniki Doktorant prezentował na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych, prowadził zajęcia ze studentami, w języku polskim i angielskim, aplikował o projekty finansowane ze źródeł zewnętrznych, a także kieruje projektem finansowanym ze środków Uniwersyteckich.

Wszystkie te aktywności wskazują, że Doktorant dobrze wywiązuje się ze swoich obowiązków i po uzyskaniu stopnia Doktora będzie z sukcesem kontynuował swoją działalność naukową dydaktyczną i organizacyjną.

PRACA DOKTORSKA

Mgr inż. Jakub Michalski do recenzji przedstawił rozprawę doktorską zatytułowaną Wykorzystanie wybranych cieczy jonowych do zwalczania lekoopornych bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* przygotowaną pod kierunkiem dr hab. Doroty Narożnej, prof. UPP oraz dr. inż. Tomasza Cłapy jako promotora pomocniczego. Praca doktorska ma układ typowy dla prac doświadczalnych i zawiera wszystkie wymagane rozdziały, zamieszczone w odpowiedniej kolejności. Podstawą jej przygotowania są trzy artykuły naukowe, które wyszczególniono na stronie 5 wraz ze wskaźnikami naukowymi, a także, od strony 68, zamieszczono w formie opublikowanych manuskryptów. Wykaz prac naukowych wchodzących w skład pracy doktorskiej obejmuje następujące publikacje:

- (P1) Morpholinium–based ionic liquids show antimicrobial activity against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, autorstwa Cłapa T., **Michalski J.**, Syguda A., Narożna D., van Oostrum P., Reimhult E., opublikowana w 2021 roku w czasopiśmie *Research in Microbiology*;



- (P2) Defeat undefeatable: Ionic liquids as novel antimicrobial agents, autorstwa Michalski J., Odrzygóźdź C., Mester P., Narożna D., Cłapa T., opublikowana w 2023 roku w czasopiśmie Journal of Molecular Liquids;
- (P3) Morpholinium-based ionic liquids as potent antibiofilm and sensitizing agents for the control of *Pseudomonas aeruginosa*, autorstwa Michalski J., Cłapa T., Narożna D., Syguda A., van Oostrum P., Reimhult E., opublikowana w 2024 roku w czasopiśmie Journal of Molecular Biology.

Łączny współczynnik wpływu (IF) tych publikacji wynosi blisko 14. Na stronie 5 podano zaniżoną wartość sumarycznej liczby punktów ministerialnych wynoszącą 210 (faktycznie jest to 310 punktów). W pierwszej publikacji doświadczalnej (P1) Doktorant jest drugim autorem, ale lektura oświadczeń współautorów, a także informacje zawarte w manuskrypcie świadczą o wiodącej roli mgr. inż. Jakuba Michalskiego w prowadzeniu opisanych badań i istotnym wkładzie w powstanie tej publikacji. W tym przypadku przy ustalaniu kolejności współautorstwa kluczowe było pozyskanie środków na prowadzenie badań, a także tworzenie koncepcji eksperymentów. W pozostałych dwóch pracach (przeglądowej P2 i doświadczalnej P3) wiodący wkład Doktoranta w ich powstanie również nie budzi wątpliwości.

W czasach stale narastającej oporności bakterii, w tym patogennych, na stosowane antybiotyki i wobec bardzo ograniczonych i trudnych do egzekwowania możliwości przeciwdziałania temu zagrożeniu podjęcie badań mających na celu weryfikację skuteczności, innych niż antybiotyki, środków do zwalczania patogenów ludzi i zwierząt należy uznać za podejście trafne i uzasadnione. Również działania zmierzające do zmniejszenia dawek stosowanych obecnie antybiotyków, w celu ograniczenia intensywności narastania zjawiska lekooporności, wpisują się w tematykę obszarów badawczych kluczowych dla bezpieczeństwa zdrowia publicznego. Z tego powodu zaproponowany **temat badawczy** należy uznać za bardzo istotny, a uzyskane wyniki z pewnością wzbudzą zainteresowanie środowiska naukowego.



Pracę rozpoczyna zwięźnie przygotowane **streszczenie**, które stanowi zarys prowadzonych badań oraz uzyskanych wyników. Jako **cel pracy** podano w nim ocenę antybakteryjnego potencjału morfoliniowych cieczy jonowych na bazie herbicydów w zwalczaniu lekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Lektura **wprowadzenia**, a także publikacji przeglądowej P2 nie wprowadza jednak czytelnika w zagadnienie herbicydowych cieczy jonowych (HILs). Uważam, że rozdział taki byłby przydatny, ponieważ Doktorant do zwalczania szczepów wielolekoopornych zastosował związki, które w pierwotnym zamyśle badane są, z różnym skutkiem, pod kątem zwalczania chwastów w uprawach. Należałoby wyjaśnić motywację do podjęcia takich właśnie prób, a także omówić potencjalne zagrożenia płynące ze stosowania HILs do zwalczania szczepów bakterii będących m.in. przyczyną zakażeń wewnątrzszpitalnych, i które przecież nie są podstawowym celem aktywności tych związków. Autor podaje co prawda, że ciecze te były wykorzystywane uprzednio w badaniach z wykorzystaniem szczepów środowiskowych, co jest zrozumiałe, gdyż w zastosowaniu polowym ciecze takie mogą wpływać na zespoły mikroorganizmów endofitycznych roślin, a także mikroorganizmy glebowe. Nowatorskie zastosowanie HILs do zwalczania szczepów wywołujących choroby człowieka wymaga moim zdaniem uzasadnienia i krytycznego przedyskutowania. **Bardzo proszę, aby Doktorant odniósł się do tej uwagi w czasie obrony pracy doktorskiej.** Chciałem równocześnie podkreślić, że uwaga powyższa nie jest kwestionowaniem koncepcji badawczej, a powodowana jest ciekawością i pewnym niedosytem w tym zakresie po lekturze przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, a także artykułu P2. Pozostałe zagadnienia omówione w tej części pracy doktorskiej i publikacji przeglądowej wprowadzają czytelnika w odpowiednim stopniu szczegółowości w tematykę pracy. Doktorant omówił zjawisko antybiotykooporności, a ponieważ obiektem badawczym Doktoranta były cztery szczepy należące do gatunku *Pseudomonas aeruginosa* w pracy podano również główne cechy tych bakterii istotne z punktu widzenia realizowanych badań. Na stronie 15 Autor podaje, że „pałeczka ropy błękitnej charakteryzuje się niskimi wymaganiami pokarmowymi”, tymczasem w badaniach stosowano bogate podłoże TSB uzupełnione dodatkiem ekstraktu drożdżowego. **Bardzo proszę Doktoranta o uzasadnienie dla wyboru takiej właśnie pożywki i wyjaśnienie dlaczego nie zastosowano podłoża uboższego (np.**



10% TSB) lub minimalnego o zdefiniowanym składzie i ograniczonej zdolności do wiązania (lub innych interakcji) testowanych HILs, antybiotyków i ich i mieszanin?

Wprowadzenie kończy charakterystyka cieczy jonowych (ILs). Jest to tekst, w którym z ogromu informacji (zaprezentowanych w pracy przeglądowej P2) Autor w umiejętny sposób przytoczył te najważniejsze, w tym omówił antybakteryjne mechanizmy działania ILs. Odpowiednio dobrany poziom szczegółowości ułatwia czytelnikowi zrozumienie kontekstu pracy. Na stronie 18 Autor wymienia aktywności biologiczne opisane dla cieczy jonowych wymieniając m.in. antybakteryjne, przeciwwirusowe i herbicydowe. **Skoro istnieją ILs o właściwościach antybakteryjnych, zastosowanie HILs w tym celu z pewnością wymaga uzasadnienia o czym pisałem już wcześniej.**

Główny cel pracy, jak i cele szczegółowe sformułowane są precyzyjnie i w pełni korespondują z przeprowadzanymi badaniami. Jako cel główny podano ocenę antybakteryjnego potencjału morfoliniowych cieczy jonowych na bazie herbicydów do zwalczania 4 lekoopornych szczepów *P. aeruginosa*, tj. PAO1, LES B58, 39016 oraz UCBPP-PA14. Dodatkowo badano wpływ testowanych HILs na wzrost i przeżywalność testowanych szczepów; oceniano ich wpływ na syntezę plocyaniny, będącej niebiałkowym czynnikiem wirulencji; określano wpływ testowanych HILs na tworzenie biofilmu i aktywność metaboliczną badanych szczepów; analizowano potencjalny efekt synergistyczny pomiędzy stosowanymi HILs i antybiotykami względem testowanych szczepów oraz oceniano aktywność hemolityczną HILs w stosunku do ludzkich erytrocytów.

Opisy części metodycznych zamieszczonych w pracy, a także w artykułach P1 i P3 są dostatecznie szczegółowe i umożliwiają powtórzenie opisanych przez Doktoranta eksperymentów. Brakuje jednak kilku informacji, które uważam za ważne. Przykładowo, autor zaznacza, że wykorzystane w badaniach szczepy różnią się m.in. szybkością wzrostu w warunkach laboratoryjnych (strona 24). W dostarczonym opracowaniu nie znalazłem natomiast informacji, czy gęstość optyczna (OD_{600}) została skorelowana z liczbą komórek bakterii występujących w hodowli poprzez wykonanie krzywych wzrostu dla każdego testowanego szczepu? Czy wszystkie cztery szczepy przy takiej samej gęstości optycznej hodowli charakteryzowały się porównywalną liczbą komórek w przeliczeniu na jednostkę objętości i czy różnice w tempie wzrostu były w jakiś sposób uwzględniane w projektowaniu i prowadzeniu eksperymentów hodowlanych?

W badaniach oprócz wymienionych uprzednio szczepów wykorzystano 12 morfoliniowych herbicydowych cieczy jonowych. Do ich syntezy wykorzystano jeden z dwóch kationów: kation 4,4-didecyłomorfoliniowy lub kation 4-decylo-4-etylomorfoliniowy oraz aniony pochodzenia herbicydowego: 2,4-dichlorofenoksyoctanowy, 4-chlorofenoksyoctanowy, dichloropirydyno-2-karboksyłanowy, 3,6-dichloro-2-metoksybenzoesanowy, 4-chloro-2-metylofenoksyoctanowy oraz (\pm)-2-(4-chloro-2-metylofenoksy)propionianowy. W badaniach, w których oceniano synergię działania HILs i antybiotyków wykorzystano 11 antybiotyków o zróżnicowanej strukturze i mechanizmie działania. Wynika z tego, że Doktorant przetestował 132 kombinacje HILs i antybiotyków wobec 4 szczepów *P. aeruginosa*, a ilość wykonanych oznaczeń z pewnością zasługuje na uznanie.

Prowadzone przez Doktoranta eksperymenty opierały się głównie na zastosowaniu metod hodowlanych, pomiarów spektrofotometrycznych oraz testów biochemicznych do wyznaczenia następujących parametrów:

- minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) testowanych herbicydowych cieczy jonowych (HILs) i antybiotyków;
- wpływu testowanych HILs na syntezę plicyjaniny będącej jednym z czynników wirulencji rodzaju *Pseudomonas*;
- aktywności dehydrogenaz w hodowlach bakteryjnych traktowanych HILs;
- wpływu testowanych HILs na tworzenie biofilmu przez wykorzystane szczepy bakterii;
- synergii działania kombinacji HILs i antybiotyków na testowane szczepy bakterii;
- aktywności hemolitycznej testowanych HILs względem erytrocytów występujących w dwóch wariantach, po procedurze oczyszczania i we krwi pełnej.

Doświadczenia przygotowano w minimum 3 powtórzeniach biologicznych, a wyniki analizowano statystycznie względem niezbędnych układów kontrolnych.



Mnogość układów badawczych sprawia, że **analiza wyników** nie była zadaniem łatwym, jednak w pracy doktorskiej Autor przytoczył te najbardziej istotne. Z kolei, w dołączonych publikacjach P1 i P3 analizę wyników ułatwiają dobrze przygotowane wykresy i ich syntetyczne opisy.

W badaniach wykazano wpływ morfoliniowych cieczy jonowych na wzrost i aktywność metaboliczną wybranych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Wykazano również, że wybrane HILs mogą zwiększać wrażliwość szczepów należących do tego gatunku na działanie antybiotyków, szczególnie kolistyny. Doktorant podkreśla jednak, że właściwości hemolityczne i promowanie powstawania biofilmu w określonych stężeniach HILs jest kluczowym czynnikiem ograniczającym ich zastosowanie w terapii ludzi i zwierząt. Duża ilość wyników z pewnością utrudniała ich analizę, jednak Doktorant sprostął temu zadaniu podsumowując prowadzone badania 9 trafnymi wnioskami zamieszczonymi na stronach 43 oraz 44. Wnioski te są poparte wynikami uzyskanymi z zastosowaniem wykorzystanych przez Doktoranta metod.

W podsumowaniu (strona 44) znajduje się informacja iż „wskazano na zdolność ILs do hamowania wzrostu i przeżywalności bakterii... **Chciałem zwrócić uwagę na fakt, że przeżywalność (wyrażona jako parametr MBC) została przez Doktoranta zweryfikowana na stałym podłożu TSB-Y jedynie w czasie nocnej (przypuszczalnie 12-godzinnej, str. 26) hodowli, co przy kontakcie szczepów z substancjami potencjalnie toksycznymi może być czasem zbyt krótkim. Zjawisko takie obserwowane jest przykładowo w hodowlach mikroorganizmów z dodatkiem czynników stresowych, np. metali ciężkich, węglowodorów, pestycydów itd. W związku z tymi analizami nasuwa się jeszcze jedno pytanie, czy Doktorant wykluczył przechodzenie komórek bakterii w stan VBNC (*ang. viable but not culturable*) w kontakcie z toksycznymi substancjami, a jeśli nie to jakie postępowanie zaproponowałby aby wykluczyć/potwierdzić to zjawisko?** Pomiary gęstości optycznej w czytnikach płytek wielodołkowych są wygodne i szybkie, jednak szczególnie przy małych objętościach hodowli i przy słabym wytrząsaniu płytek mogą nie być dostatecznie precyzyjne. Są natomiast przydatne jako narzędzie przesiewowe w badaniach wpływu HILs i kombinacji HILs i antybiotyków na wzrost konkretnego szczepu. Porównanie szczepów o różnym tempie wzrostu w czasie krótkotrwałych 12 - 24 godzinnych hodowli może być z kolei kłopotliwe i nieprecyzyjne. Dłuższe hodowle nastroją problemów związanych z utrudniającym pomiary parowaniem pożywki





i zakażeniami mikrobiologicznymi. W doświadczeniu, w którym oceniano występowanie efektu synergii Doktorant wykorzystywał jedynie pomiary gęstości optycznej, w tym przypadku również wskazane byłyby hodowle na pożywkach stałych przez dłuższy niż 12 godzin okres czasu.

Na stronie 32, Doktorant jako przyczynę niewrażliwości szczepu 39016 przypuszcza, że cecha ta może być związana m.in. z budową lipopolisacharydu (LPS). Niestety, w żaden sposób tego nie weryfikuje, a izolacja LPS z testowanych szczepów jest prostym zadaniem i po kilku dniach pracy można takie izolaty rozdzielić na żelu poliakrylamidowym i z użyciem odpowiedniego wzorca wnioskować, czy któryś z testowanych szczepów miał LPS niekompletny na podstawie masy LPS w porównaniu z pozostałymi. Co istotne, można również taką analizę wykorzystać do porównania LPS szczepów kontrolnych i szczepów poddanych działaniu HILs. **Powyższe uwagi mają na celu zachęcenie Doktoranta do weryfikacji i uzupełnienia najciekawszych wyników o kolejne rezultaty uzyskane z zastosowaniem innych metod badawczych. Otrzymane w ten sposób dane z pewnością wzbogaciłyby całościową analizę prowadzonych doświadczeń.**

Zdaję sobie sprawę, że przedstawiona do recenzji rozprawa powstała na podstawie trzech (w tym dwóch doświadczalnych) opublikowanych artykułów naukowych, które przeszły cały proces wydawniczy, w tym zostały zrecenzowane przez specjalistów z danego tematu. Cechą osoby posiadającej stopień doktora jest jednak umiejętność także krytycznej dyskusji naukowej, do czego, mam nadzieję, moja recenzja zachęci mgr. inż. Jakuba Michalskiego w czasie publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Zachęcam również Doktoranta, w razie kontynuowania pracy naukowej w tym temacie, do podjęcia próby wykorzystania dostępnych sekwencji genomów testowanych szczepów w analizach bioinformatycznych. Aspekt molekularny został w tej pracy całkowicie pominięty, a przecież dostępne sekwencje umożliwiają poszukiwanie genów, których produkty ekspresji odpowiedzialne są m.in. za badane przez Doktoranta zjawiska formowania biofilmu czy produkcji plicyjaniny i innych czynników wirulencji. Te analizy nie wymagają ponoszenia praktycznie żadnych kosztów. Kolejnym etapem może być badanie ekspresji zidentyfikowanych genów w różnych układach badawczych.





Współczesna nauka wymaga coraz częściej łączenia klasycznych metod hodowlanych z technikami molekularnymi i niespełnianie tego warunku może doprowadzić do trudności publikacyjnych w prestiżowych czasopismach, mimo otrzymania wartościowych wyników.

Ostrożne podejście Doktoranta do uzyskanych wyników przejawia się w konkluzji iż aktywność hemolityczna i promowania tworzenia biofilmu stwierdzona dla niektórych HILs, uniemożliwia lub ogranicza możliwość ich stosowania w zwalczaniu szczepów wielolekoopornych w czasie terapii pacjentów. **Autor nie wykluczył jednak ich zastosowania jako środków dezynfekcyjnych. Czy jest to jednak konieczne? Czy takie użycie nie przyczyni się do nabywania i szerzenia mechanizmów oporności na HILs u roślin? Tego typu dyskusji zabrakło w pracy i w artykułach będących jej podstawą. Chciałem także zwrócić uwagę, że krytyczne podejście może dotyczyć również stosowanych metod i podejścia badawczego.**

Podsumowując, praca doktorska przygotowana przez mgr. inż. Jakuba Michalskiego stanowi wartościowy wkład Doktoranta w rozwój nauki z zakresu potencjalnego zastosowania herbicydowych cieczy jonowych. W swojej recenzji nie zawarłem żadnej uwagi, która podważałaby wartość uzyskanych wyników i zasadność prowadzonych badań, a moje komentarze mają charakter dyskusyjny do czego po raz kolejny zachęcam Doktoranta w czasie publicznej obrony pracy doktorskiej. Na uwagę zasługuje fakt, że są to wyniki już opublikowane, na podstawie których mogą być planowane i weryfikowane kolejne hipotezy badawcze, także przez innych naukowców. Dzieło Doktoranta i Współpracowników przyczynia się więc z pewnością do rozwoju nauki.

Do **mocnych stron** pracy doktorskiej zaliczyć należy nowatorski temat badań i podjęcie próby rozwiązania niezwykle ważnego problemu narastającej wielolekooporności szczepów bakterii. Atutem pracy jest duża ilość wartościowych, także z praktycznego względu, wyników, tj. przetestowanie wpływu wielu herbicydowych cieczy jonowych, antybiotyków i ich mieszanin na wzrost i formowanie biofilmów przez 4 szczepy *P. aeruginosa*. Niewątpliwie na uznanie zasługuje również opublikowanie uzyskanych rezultatów oraz części teoretycznej w czasopismach z listy JCR. Na podstawie tekstu rozprawy doktorskiej wnioskuję, iż Doktorant posiadał umiejętność planowania

i prowadzenia badań, interpretacji uzyskanych wyników, a także cenną umiejętność do syntetycznego ich podsumowania oraz wyciągania trafnych wniosków.

Do **słabszych stron** zaliczam, brak uzasadnienia wykorzystania HILs do zwalczania szczepów wywołujących zakażenia człowieka, brak omówienia potencjalnych korzyści i zagrożeń ich stosowania w tym celu, wykorzystanie w pracy wyłącznie metod hodowlanych - głównie pomiarów gęstości, z pominięciem zastosowania metod molekularnych, czy chromatograficznych, a także brak niektórych informacji metodycznych, o których wspominałem we wcześniejszych fragmentach recenzji. W tekście pracy doktorskiej dyskusja jest ograniczona, jednak lektura artykułów P1 i P3 dowodzi, że i tę umiejętność Doktorant opanował w wymaganym stopniu.

WNIOSEK KOŃCOWY

Po zapoznaniu się z otrzymanymi materiałami jestem przekonany, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. inż. Jakuba Michalskiego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). **Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr. inż. Jakuba Michalskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauki rolnicze, dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.**

Tomasz Płociniak