Politechnika Łódzka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Łódź, 20-07-2020r.

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Klewicka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Aleksandry Marii Kocot

zatytułowanej „Biofilm bakteryjny – koegzystencja oraz inaktywacja komórek w zależności od wariantu hodowli",

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Łucji Łaniewskiej-Trokenheim i promotora pomocniczego dr Magdaleny Anny Olszewskiej,

w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Ocena formalna pracy

Przedstawiona od oceny rozprawa jest cyklem 3 publikacji powiązanych tematycznie opublikowanych w latach 2017-2020. Publikacje ukazały się w czasopismach: LWT-Food Science and Technology (2) i Journal of Food Safety (1). Jedna publikacja jest pracą przeglądową natomiast 2 prace są pracami oryginalnymi. Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) tych publikacji to 8,508 a suma punktów wg listy MNiSW po 31.07.2019 wynosi 240. Przedstawiony cykl publikacji został poprzedzony opisem (dalej zwanym komentarzem), który zawiera: wstęp, cel pracy, hipotezy badawcze, materiały i metody, omówienie wyników, piśmiennictwo, liczbowe zestawienie dorobku naukowego, załączniki w którym dołączono kopie publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Wszystkie publikacje są

dwuautorskie. Udział doktorantki wg załączonych oświadczeń wynosi od 51 do 60% co świadczy o dużym wkładzie pracy i zaangażowaniu w powstanie tych prac. Szkoda, że w żadnej z tych prac Pani Aleksandra M. Kocot nie jest autorem korespondencyjnym.

Ocena merytoryczna pracy

Biofilmy tworzone przez bakterie (często chorobotwórcze i oportunistyczne) są dużym wyzwaniem dla sektora medycznego i producentów żywności a w konsekwencji dla każdego z nas. Wiadomo, że w środowisku mikroorganizmów jest to zjawisko dość szeroko rozpowszechnione, aczkolwiek nie zawsze jest ono korzystne z punktu widzenia człowieka. Zatem podjęta w dysertacji tematyka poznania oporności na środki utrudniające tworzenie i dezintegrujące biofilmy jednogatunkowe i dwugatunkowe jest aktualna i uzasadniona. Jako model badawczy wybrano bakterie *Listeria* spp. Mikroorganizmami towarzyszącymi i tworzącymi mieszane biofilmy z przedmiotem badań były bakterie gram-dodatnie: *Lactobacillus plantarum* i *Staphylococcus aureus* oraz szczepy bakterii gram-ujemnych *Pseudomonas areuginosa* i *Pseudomonas fluorescens.*

W pierwszej publikacji - przeglądowej zatytułowanej „Biofilm formation and microscopic analysys of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in food processing context" (LWT - Food Science and Technology) stanowiącej element rozprawy doktorskiej Autorka dokonuje wnikliwej analizy czynników biotycznych i abiotycznych warunkujących tworzenie biofilmów przez bakterie *Listeria monocytogenes*. Analizuje również stan wiedzy na temat skuteczności chemicznych i fizycznych strategii ograniczania biofilmów, tworzonych przez te bakterie na różnych powierzchniach mających kontakt z żywnością, zarówno podczas procesu produkcyjnego jak i podczas przechowywania. W kolejnej części publikacji dokładnie omówiono metody mikroskopowe stosowane w badaniach dotyczących tworzenia i struktury biofilmów. Przedstawione studia literaturowe dobrze przygotowały Doktorantkę do podjęcia realizacji części eksperymentalnej.

W drugiej publikacji „Interaction and inactivation of *Liseria* and *Lactobacillus* cells in single and mixed species biofilms exposed to different disinfectants" (Journal of Food Safety) Doktorantka przedstawia wyniki eksperymentów dotyczących jednogatunkowych i mieszanych biofilmów bakterii należących do gatunków: *Listeria monocytogenes* – 2 szczepy, *Listeria innocua* – 1 szczep oraz 3 szczepy należące go gatunku *Lactobacillus plantarum.* Tworzone biofilmy poddawane były działaniu chemicznych środków dezynfekujących: czwartorzędowych związków amoniowych, trzeciorzędowych

alkiloamin oraz związków na bazie chloru. W przypadku tworzenia biofilmów jednogatunkowych przyrost komórek bakterii tworzących biofilmy przyrastał do 24 godziny, natomiast wraz z wydłużaniem czasu liczba komórek bakterii tworzących biofilm malała. W przypadku biofilmu dwugatunkowego *Listeria - Lactobacillus* stwierdzono mniejszą liczbę komórek poszczególnych gatunków bakterii niż w przypadku biofilmów jednokulturowych. W przypadku biofilmów dwugatunkowych liczbowo (nieznacznie) dominuje *Listeria innocua* natomiast nie są to różnice statystycznie istotne. Oporność biofilmów na środki dezynfekcyjne badano w dwóch punktach czasowych: 24 godziny – młody biofilm i 72 godziny – biofilm dojrzały. Autorka stwierdziła, że młode jednogatunkowe jak i dwugatunkowe biofilmy charakteryzowały się niższą opornością na działanie chemicznych związków dezynfekujących niż biofilmy dojrzałe. Ważnym spostrzeżeniem Autorki w kontekście „architektury" bioflimu mieszanego jest zewnętrze ułożenie bakterii *Lactobacillus plantarum* a bardziej wewnętrze *L. innocua*. Ochronną rolę bakterii *L.plantarum* w stosunku do *L.innocua* Doktorantka tłumaczy obecnością zewnątrzkomórkowego EPS. Czy na poparcie tej tezy oznaczono zdolność badanych szczepów *L.plantarum* do syntezy EPS? Jaki rodzaj EPS był wytwarzany – kapsularny czy typu „slime"?

W trzeciej pozycji składającej się na rozprawę doktorską zatytułowanej „Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with *Listeria innocua* in dual species biofilm and inactivation following disinfectant" Autorka omawia wyniki badań dotyczących ograniczania tworzenia biofilmów mieszanych z *L. innocua* na powierzchniach polistyrenowych, natomiast analizę mikroskopową przeprowadza dla biofilmów utworzonych na powierzchni szklanej. Do dezaktywacji stosuje te same roztwory dezynfektantów co w publikacji nr 2. W przypadku tworzenia biofilmu dwugatunkowego *Pesudomonas – Listeria,* dominującym mikroorganizmem zarówno w biofilmie młodym jak i dojrzałym są bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Odmienną sytuację obserwujemy w biofilmie tworzonym przez bakterie *Staphylococcus* i *Listeria*. W tym przypadku w młodym biofilmie dominuje *Listeria*, natomiast wraz z upływem czasu różnice się zacierają (brak różnic statystycznych). Zatem nie mogę zgodzić się z Doktorantką, ze w przypadku biofilmów mieszanych *Listeria – Staphylococcus* mikroorganizmem dominującym jest *Listeria*. Dominacja bakterii z rodzaju *Listeria* w układzie biofilmu z bakteriami *Staphylococcus* zależna jest od czasu.

W przypadku inaktywacji biofilmów dwugatunkowych tworzonych przez bakterie *Listeria-Staphylococcus* biofilmy dojrzałe wykazywały wyższą oporność na stosowane środki dezynfekcyjne. Natomiast w układzie bakterii *Pseudomonas-Listeria* sytuacja jest odwrotna młode biofilmy są bardziej oporne na środki dezynfekcyjne niż starsze.

Niestety nie mogę odnieść się do wyników omawianych w załączonym komentarzu na str. 34-35 dotyczących tworzenia i dezintegracji biofilmów jednogatunkowych bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* i *S.aureus*. Wyniki te zostały zamieszczone w materiałach dodatkowych do publikacji 3. Niestety, dostęp do publikacji jest subskrypcyjny, a Doktorantka nie zamieściła tych materiałów w swojej dysertacji.

Analiza mikroskopowa i zastosowanie metody FISH (fluorescencyjna *in situ* hybrydyzacja) oraz testu LIVE/DEAD pozwoliło Doktorantce określić mechanizm działania zastosowanych dezynfektantów na bakterie tworzące biofilmy mieszane. Zastawanie dezynfektantów na bazie czwartorzędowych związków amoniowych oraz trzeciorzędowych alkiloamin powodowało obumieranie komórek bakterii *Lactobacillus plantarum* natomiast komórki bakterii *Listera innocua* pozostały nienaruszone. Jest to oczywiście uzasadnione zewnętrzną lokalizacją bakterii *Lactobacillus* w biofilmie co Doktorantka wcześniej wykazała. Działanie dezynfektantów na bazie chloru nie niszczyło zewnętrznych struktur komórkowych bakterii formujących biofilm, natomiast powodowało niszczenie samej struktury biofilmu. W przypadku biofilmu tworzonego przy współudziale bakterii gram-ujemnych *Pseudomonas aeruginosa* po zastosowaniu czwartorzędowych związków amoniowych oraz trzeciorzędowych alkiloamin oraz pochodnych chloru obserwowano oprócz uszkodzeń błon cytoplazmatycznych bakterii również uszkodzenia i niszczenie biofilmu. Najbardziej oporny na zastosowane w badaniu dezynfektanty okazał się biofilm utworzony przez bakterie *Staphylococcus* i *Listeria.* O ile działanie czwartorzędowych soli amoniowych oraz trzeciorzędowych alkiloamin wykazywało uszkodzenie zewnętrznych struktur komórek bakterii, to dezynfektanty na bazie chloru nie powodowały tego typu uszkodzeń i nie wpływały znacząco na strukturę biofilmu.

Ten element pracy uważam za szczególnie wartościowy i wytyczający kierunek dalszych badań dotyczący oddziaływań dezynfektantów na kultury i biofimy mieszane.

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
90-924 Łódź, ul. Wólczańska 171/173, budynek A4
tel. 42 631 34 79, fax 42 631 32 74, e-mail: itfim@p.lodz.pl,
www.snack.p.lodz.pl

W rozdziale 4 załączonego komentarza Autorka zamieszcza stwierdzenia końcowe i podsumowanie gdzie jest wypunktowanych 10 stwierdzeń.
Kwintesencją pracy doktorskiej są wnioski, które tutaj zostały bardzo nieśmiało napisane a mianowicie jako dwa akapity pod stwierdzeniami.

Postawione dwie hipotezy badawcze: 1) „Pałeczki *Listeria* tworzą biofilmy i wchodzą w interakcje z innymi drobnoustrojami, tworząc biofilmy dwugatunkowe"; 2) „Interakcje międzygatunkowe w biofilmach z pałeczkami *Listeria* wpływają na przeżywalność drobnoustrojów w warunkach stresowych (środki dezynfekcyjne)"; zostały zweryfikowane pozytywnie.

Zdaję sobie sprawę, że Doktorantka miała ograniczenia czasowe realizacji pracy doktorskiej i być może z tego wynika brak pogłębienia badań jakie interakcje oprócz współistnienia w biofilmach zachodzą pomiędzy mikroorganizmami.

Wniosek końcowy

Przedstawiony cykl 3 publikacji opatrzony wspólnym tytułem "Biofilm bakteryjny – koegzystencja oraz inaktywacja komórek w zależności od wariantu hodowli" spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm. Założone cele badawcze zostały zrealizowane, a postawione hipotezy pozytywnie zweryfikowane. Ponadto, praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a uzyskane wyniki mają wpływ na rozwój wiedzy w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. W oparciu o powyższe przesłanki wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani Aleksandry Marii Kocot i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania.

Elżbieta Ulewicka

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
90-924 Łódź, ul. Wólczańska 171/173, budynek A4
tel. 42 631 34 79, fax 42 631 32 74, e-mail: itfim@p.lodz.pl,
www.snack.p.lodz.pl