

Prof. dr hab. Katarzyna Czaczyk
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-637 Poznań

RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr Aleksandry Marii Kocot
pt. „Biofilm bakteryjny – koegzystencja oraz inaktywacja komórek
w zależności od wariantu hodowli”**

wykonanej w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności
na Wydziale Nauk o Żywności
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
**pod kierunkiem prof. dr hab. Łucji Łaniewskiej-Trokenheim
oraz promotora pomocniczego dr Magdaleny Anny Olszewskiej**

Opracowanie niniejszej recenzji jest uzasadnione decyzją Rady Wydziału Nauk o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o powołaniu mnie na Recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Aleksandry Marii Kocot (pismo z dnia 18.06.2020).

Dobór i znaczenie tematu

Tworzenie się biofilmów bakteryjnych na powierzchniach kontaktujących się z żywnością stanowi duży problem z punktu widzenia przemysłu spożywczego. Może to być przyczyną skażenia produktów spożywczych drobnoustrojami powodującym psucie się żywności i/lub drobnoustrojami chorobotwórczymi. Ma też negatywne aspekty ekonomiczne, np. utrudniony transfer ciepła na urządzeniach takich jak wymienniki ciepła czy pasteryzatory, wzrost tarcia na elementach ruchomych maszyn, co w konsekwencji powoduje większe zużycie energii elektrycznej. Ponadto usuwanie biofilmów bakteryjnych z powierzchni kontaktujących się z żywnością jest trudne i nie zawsze skuteczne.

Tworzenie się biofilmów bakteryjnych na powierzchniach abiotycznych jest procesem wieloetapowym, obejmującym adhezję odwracalną, adhezję nieodwracalną, formowanie dojrzałej struktury biofilmu oraz odrywanie się komórek z peryferyjnych części biofilmu.

Następuje różnicowanie się komórek w obrębie biofilmu. Drobnoustroje pozostające w warstwach zewnętrznych błony biologicznej wykazują wysoką aktywność metaboliczną oraz zdolność do szybkich podziałów. Komórki wewnętrznych warstw biofilmu są mniejsze, charakteryzują się spowolnionym wzrostem i bardzo często pozostają w stanie anabiozy. Jednakże należy zdać sobie sprawę z faktu, że biofilm jest dominującą formą występowania drobnoustrojów w środowisku naturalnym, a badanie zjawiska tworzenia biofilmów w warunkach laboratoryjnych nie zawsze odzwierciedla wszystkie oddziaływania jakie występują w przyrodzie.

Chociaż początki badań nad adhezją sięgają XVII wieku (Antoni van Leeuwenhoek), to zjawisko to nadal stanowi przedmiot zainteresowania wielu zespołów badawczych. Co roku powstaje wiele publikacji związanych z procesem tworzenia się biofilmów, zarówno na powierzchniach ożywionych jak i abiotycznych. Jednakże większość z nich jest związana z aspektem medycznym i zakażeniami pochodzącymi od implantów i stosowanych przyrządów, takich jak cewniki, zespolenia kostno-stawowe, szkła kontaktowe itp. oraz adhezją bakterii do powierzchni zębów i ich wypełnień, co powoduje powstawanie płytki nazębnej, próchnicę czy paradontozę. Dotychczas stosunkowo niewiele uwagi poświęcano biofilmom powstającym na powierzchniach kontaktujących się z żywnością, które również stanowią istotny element w badaniach nad adhezją. Ponadto większość badań jest prowadzona dla biofilmów jednogatunkowych. W tym kontekście podjęta przez Doktorantkę tematyka badań jest aktualna i ciekawa, w szczególności pod względem aplikacyjnym.

Ocena formalnej strony pracy

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Kocot jest zbiorem trzech publikacji - jednej pracy przeglądowej i 2 prac oryginalnych. Ponadto do pracy dołączono ponad 30 stronicowe omówienie osiągnięć badawczych uzyskanych w ramach realizacji tej dysertacji, w którym sformułowano cele pracy i hipotezy badawcze. Pewne zastrzeżenia Recenzenta budzi tytuł tego opracowania, a w szczególności jego ostatni człon „...w zależności od wariantu hodowli”. Jakie różne warianty hodowli zastosowała Autorka w niniejszych badaniach?

Załącznik I zawiera oświadczenia współautorów o ich udziale w realizacji materiału naukowego przedstawionego w poszczególnych publikacjach. Wszystkie prace są dwuautorskie – A.Kocot i M.Olszewska. Wg tych oświadczeń udział Pani Aleksandry Kocot w realizacji tych prac wynosi od 51-60%. We wszystkich tych publikacjach Doktorantka jest pierwszym Autorem, ale w żadnej nie jest Autorem korespondencyjnym (dlaczego?). Wkład

Pani Aleksandry Kocot w tworzeniu tych publikacji polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji artykułów, zaplanowaniu eksperymentów, studiach literaturowych, przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń oraz współudziale w analizie danych, interpretacji wyników i napisaniu manuskryptu.

Przedstawiony do oceny zbiór publikacji, stanowiący podstawę do ubiegania się o tytuł doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia, to prace opublikowane w latach 2017-2020, o łącznym współczynniku IF = 8,508 i łącznej punktacji MNiSW 180 pkt. (zgodnie z rokiem opublikowania).

Ocena merytoryczna pracy

Pierwsza z prac cyklu przedstawionego do oceny to publikacja przeglądowa pt. „Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in food processing context”, opublikowana w LWT – Food Science and Technology w 2017 roku (84: 47-57). W pracy tej przedstawiono proces tworzenia się biofilmów *Listeria monocytogenes*, wyniki prac badawczych dotyczących inaktywacji i oporności na środki dezynfekcyjne biofilmów tworzonych przez te bakterie oraz możliwości wykorzystania metod mikroskopowych w badaniu struktury tych biofilmów, takich jak, mikroskopia fluorescencyjna i epifluorescencyjna, elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia konfokalna czy hybrydyzacja DNA. Publikacja ta stanowi dobre wprowadzenie teoretyczne do niniejszej dysertacji i świadczy o dobrym stanie wiedzy Doktorantki i znajomości bieżącej literatury dotyczącej badań nad tworzeniem biofilmów przez bakterie *Listeria monocytogenes*, ich oporności na środki dezynfekcyjne oraz mikroskopowych metod ich badania.

W dołączonym do pracy omówieniu osiągnięć badawczych uzyskanych w ramach realizacji tej dysertacji, zamieszczono również wprowadzenie teoretyczne, w którym przedstawiono bardzo podstawowe informacje dotyczące tworzenia się biofilmów bakteryjnych w przemyśle spożywczym, sposobów zwalczania biofilmów oraz mikroskopowych metod ich badania. Zdaniem Recenzenta ten wstęp byłby dużo ciekawszy, gdyby uzupełnić go w informacje dotyczące badań nad adhezją do powierzchni kontaktujących się z żywnością bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* czy *Lactobacillus plantarum*. Tym bardziej, że w dwóch następnych publikacjach tego cyklu, tych informacji też nie ma zbyt dużo.

Druga publikacja tego cyklu, „Interaction and inactivation of *Listeria* and *Lactobacillus* cells in single and mixed species biofilms exposed to different disinfectants”, została opublikowana w *Journal of Food Safety* (2019; e 12713). Celem przeprowadzonych badań była ocena tempa tworzenia biofilmów jednogatunkowych przez drobnoustroje z rodzajów *Listeria* i *Lactobacillus*, i dwugatunkowych (oba rodzaje) oraz określenie wpływu środków dezynfekcyjnych na bazie czwartorzędowych związków amoniowych, trzeciorzędowych alkiloamin oraz na bazie chloru, na inaktywację tych biofilmów w zależności od dojrzałości biofilmu. Za szczególnie interesujące uważam badania nad oceną wpływu środków dezynfekcyjnych na określenie bioróżnorodności i żywotności komórek bakteryjnych w biofilmach dwugatunkowych *Listeria* sp. i *Lactobacillus* sp. Zastosowanie nowoczesnych metod badawczych, takich jak fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, pozwoliło na określenie udziału poszczególnych szczepów oraz ich rozmieszczenia w biofilmie. Z kolei wykorzystanie barwienia LIVE/DEAD dało możliwość oceny żywotności komórek bakteryjnych w biofilmach po potraktowaniu ich testowanymi środkami dezynfekcyjnymi. Uzyskane rezultaty wskazują, że *Listeria innocua* lokuje się głównie w wewnętrznych warstwach biofilmu, a *Lactobacillus plantarum*, na jego obrzeżach. Jak, zdaniem Doktorantki, można wytłumaczyć to zjawisko, biorąc pod uwagę fakt, że oba gatunki są zaliczane do względnych beztlenowców, ze wskazaniem na to, że jednak bardziej beztlenowe warunki są wymagane do wzrostu *Lactobacillus* spp.? Bardzo ciekawe są też wyniki dotyczące różnego oddziaływania środków dezynfekujących na biofilmy dwugatunkowe *Listeria* sp. i *Lactobacillus* sp. Czwartorzędowe związki amoniowe i trzeciorzędowe alkiloaminy spowodowały większy udział komórek martwych w biofilmie, głównie z rodzaju *Lactobacillus*, a związek na bazie chloru wywoływał nie tylko uszkodzenie błon cytoplazmatycznych, ale również rozerwanie struktury biofilmu i odrywanie się agregatów komórkowych (ocena stopnia adhezji wg metody opisanej przez Le Thi i wsp., 2001). Pewne zastrzeżenia Recenzenta budzi fakt, że do oceny tempa tworzenia biofilmów wykorzystywane były powierzchnie polistyrenowe, a do oceny różnorodności i żywotności komórek, powierzchnie szklane. Jednym z czynników warunkujących adhezję mikroorganizmów do powierzchni abiotycznych jest hydrofobowość/hydrofilowość tych powierzchni. W przypadku zastosowanych materiałów powierzchnia szklana uważana jest za hydrofilową, a powierzchnia polistyrenowa za hydrofobową. Poproszę, żeby Doktorantka ustosunkowała się do tego faktu, przy czym chciałam zaznaczyć że Recenzent zdaje sobie sprawę z trudności metodycznych w badaniu procesu adhezji i tworzenia się biofilmów i pewnych ograniczeniach wykorzystywanych technik badawczych.

Ostatnią publikacją cyklu jest praca „Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with *Listeria innocua* in dual species biofilms and inactivation following disinfectant treatments”, opublikowana w LWT – Food Science and Technology w 2020 roku (118: 108736). Wyniki przedstawione w ramach tej pracy są kontynuacją badań nad koegzystencją oraz inaktywacją komórek w biofilmach jedno- i dwugatunkowych. Wykorzystując podobne metody i techniki badawcze dokonano oceny tempa tworzenia i udziału poszczególnych gatunków dla biofilmów mieszanych *Listeria innocua* i *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Listeria innocua* i *Staphylococcus aureus*. Określono także wpływ środków dezynfekcyjnych (tych samych, co w poprzedniej pracy) na inaktywację tych biofilmów w zależności od stopnia dojrzałości. Analiza mikroskopowa dwugatunkowego biofilmu *Listeria innocua* i *Pseudomonas aeruginosa* pozwoliła zaobserwować zbliżony udział obydwu gatunków w dojrzałej matrycy błony biologicznej, natomiast w przypadku *Listeria innocua* i *Staphylococcus aureus* dominującą większość stanowiły gronkowce. Bardzo interesujące są wyniki badań nad wpływem środków dezynfekcyjnych na mieszane biofilmy w zależności od stopnia ich dojrzałości. Mieszany biofilm *Listeria innocua* i *Staphylococcus aureus* był bardziej odporny gdy inaktywowano dojrzałą formę w przeciwieństwie do *Listeria innocua* i *Pseudomonas aeruginosa* który wykazywał większą odporność w 24h biofilmie (podobne obserwacje poczyniono dla biofilmów jednogatunkowych tych trzech gatunków bakterii). W dyskusji Autorki tłumaczą ten fakt tym, że być może *Pseudomonas aeruginosa*, jako modelowy mikroorganizm w badaniach nad adhezją, tworzy dojrzałą strukturę już po 24 godzinach, a w kolejnych godzinach dochodzi do dyspersji komórek do otoczenia i odsłaniania kolejnych warstw biofilmu, które są bardziej wrażliwe na stosowane środki dezynfekcyjne. Jednakże w badaniach nad tempem wzrostu biofilmu jednogatunkowego *Pseudomonas aeruginosa*, nie zaobserwowano spadku liczby komórek w biofilmie, a raczej nieznaczny ich wzrost...

Przedłożoną mi do recenzji rozprawę dysercacyjną przeczytałam z dużym zaciekawieniem. Uzyskane wyniki uważam za wartościowe i wnoszące cenne informacje do wiedzy o biofilmach. Zdając sobie sprawę, że publikacje wchodzące w skład tej rozprawy były już recenzowane przed przyjęciem do druku, to i tak w trakcie czytania wyłoniły się pewne pytania o charakterze dyskusyjnym. Postawione przeze mnie uwagi mają na celu wywołanie dyskusji z Autorką, która przyczyniłaby się do lepszego zrozumienia zjawisk obserwowanych w tych badaniach i nie mają one istotnego wpływu na końcową, pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej Pani Aleksandry Kocot.

Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską mgr Aleksandry Marii Kocot oceniam pozytywnie. Stwierdzam, że przedstawiony do oceny cykl trzech publikacji naukowych jest oryginalnym i znaczącym wkładem naukowym do działy wiedzy, dotyczącej tworzenia się biofilmów na powierzchniach kontaktujących się żywnością. Jest to dobrze zaplanowane i poprawnie wykonane studium naukowe, co świadczy o dojrzałości Autorki i Jej dobrym przygotowaniu merytorycznym, a w szczególności warsztatowym. Na uwagę zasługuje również pozostały dorobek Doktorantki. Poza pracami przedstawionymi jako rozprawa dysercyjna, Pani Aleksandra Kocot jest współautorem 8 prac oryginalnych (o łącznym IF=9,335), 3 recenzowanych artykułów pokonferencyjnych, jednego rozdziału w monografii, 4 doniesień na konferencjach międzynarodowych oraz 11 doniesień na konferencjach krajowych (w tym 8 przedstawionych w formie ustnej). Ponadto Doktorantka była kierownikiem projektu NCN w ramach konkursu PRELUDIUM 11, z którego częściowo zostały sfinansowane badania przeprowadzone w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Aleksandry Marii Kocot pt. „Biofilm bakteryjny – koegzystencja oraz inaktywacja komórek w zależności od wariantu hodowli”, odpowiada wymaganiom ustawowym (Ustawa z dnia 14 marca 2003 roku, o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm. oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora, Dz. U. 2014, poz. 1383, z późn. zm.). W związku z tym wnoszę o jej przyjęcie przez Radę Dyscypliny technologia żywności i żywienia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.



Katarzyna Czaczyk