



Warszawa, dn. 19 stycznia 2023 r.

Dr hab. Piotr Bednarczyk, prof. SGGW
Katedra Fizyki i Biofizyki
Instytut Biologii/SGGW
ul. Nowoursynowska 159, bud. 34, pok. 74
02-776 Warszawa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr Jarosława Rachuna
pt. „OPTYMALIZACJA SYSTEMU INTERFEROMETRYCZNEGO
DO BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI
PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH BAKTERIOFAGÓW I
WYBRANYCH ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Michała Arabskiego, prof.
UJK oraz dra Sławomira Wąsika

w Zakładzie Biologii Medycznej Wydziału Nauk Ścisłych i
Przyrodniczych, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Biologii
Katedra Fizyki i Biofizyki

ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
+48 22 59 386 20

piotr_bednarczyk@
sggw.edu.pl
kfb@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl
www.kf.sggw.pl

Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi monografię opracowaną zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych w zakresie nauk biologicznych. Zawiera 90 stron i klasyczny podział na: Spis treści, Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Piśmiennictwo oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim. Tematyka badawcza, bez wątpienia, podejmuje aktualne trendy badawcze. Ponad połowa (67 z 128) wszystkich cytowani stanowią publikacje z ostatnich 10 lat (2012-2022). Część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z bardzo dobrymi parametrami nukometrycznymi. Badania naukowe zostały przeprowadzone we współpracy z krajowymi i



zagranicznymi ośrodkami naukowymi (Uniwersytet Wrocławski; Instytut Niskich Temperatur PAN we Wrocławiu; Uniwersytet Medyczny w Łodzi; University of Alcalá, Hiszpania, Madryt; Wilkes University, USA) i sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w ramach projektu krajowego OPUS o numerze 2016/21/B/NZ6/01157.

Tytuł rozprawy doktorskiej jest poprawnie sformułowany i częściowo odzwierciedla cel badań przeprowadzonych przez Doktoranta.

W części teoretycznej Doktorant w pięciu podrozdziałach przedstawia podstawy natury światła, dyfuzji substancji, transportu substancji przez błony biologiczne, zastosowania interferometrii w naukach fizycznych oraz zastosowania metody interferometrii laserowej w badaniach mikrobiologicznych opartych na procesie dyfuzji.

Wstęp do rozprawy doktorskiej został napisany poprawnie zarówno pod względem merytorycznym jak i językowym oraz stanowi 1/3 jej objętości. Jego forma i treść świadczą o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta do realizacji postawionych celów.

Cel rozprawy doktorskiej zawarty został na stronie 37. Ogólnym celem jest optymalizacja systemu interferometrycznego dedykowanego do badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych bakteriofagów i wybranych związków chemicznych. Dodatkowo na realizację celu ogólnego składają się cele szczegółowe dotyczące wprowadzenia rozwiązań umożliwiających prowadzenie badań w zakresie degradacji i hamowania tworzenia biofilmu, dyfuzji karboksykrzemianowych dendrymerów i tiocukrów przez biofilm, analiza uwalniania flukonazol czy ocena degradacji polimeru typu hydroksyapatyt. Jednak nie jest do końca jasne ostatnie zdanie podsumowujące cel pracy. A szczególnie sformułowanie „badania modelowe ... były elementem szerszych analiz ...”. Co Doktorant miał na myśli wskazując na szersze analizy?

Rozdziały 3. Materiały i 4. Metody zawierają szczegółowy opis wykorzystanych organizmów modelowych, związków chemicznych, materiałów oraz technik doświadczalnych. Bardzo przydatne jest zamieszczenie, w tych rozdziałach, Tabel i Schematów, które ułatwiają zrozumienie wykonanych doświadczeń. Zaplanowane doświadczenia zostały przeprowadzone z wykorzystaniem interferometrii laserowej a głównym elementem układu był interferometr Macha-Zehndera. Równolegle zaplanowane zostały badania efektu bakteriofagów na biofilm w tym analiza interferometryczna uwalniania bakteriofagów z agarozy, degradacja dojrzałego biofilmu PAO1, hamowanie tworzenia biofilmu, analiza spektrofotometryczna produkcji



barwników czy barwienie macierzy biofilmu fioletem krystalicznym. Dodatkowo, Doktorant przedstawił metody analizy dyfuzji związków bakteriobójczych przez biofilm, analizę degradacji hydrożelu przez lizozym czy analizę uwalniania flukonazol z hydrożelu. Obok technik biofizycznych wykorzystane zostały również metody biologii molekularnej takie jak RT-PCR czy mikroskopia fluorescencyjna. Przeprowadzona analiza statystyczna wykonana została przy użyciu oprogramowania STATISTICA, v. 12. Przedstawiony opis metodologii wskazuje na bogaty warsztat badawczy wykorzystany przez Doktoranta. Dodatkowo, na uznanie zasługuje również szczegółowy opis działania interferometrii laserowej poczynając od inicjacji fali a kończąc na analizie otrzymanych sygnałów. Wszystko to, świadczy o znakomitym przygotowaniu merytorycznym jaki i technicznym Doktoranta do realizacji postawionych celów rozprawy.

W rozdziale 5. Wyniki, Pan mgr Jarosław Rachuna przedstawił oraz udokumentował otrzymane wyniki przeprowadzonych badań w formie opisowej oraz graficznej. Rozdział ten zawiera Tabele (5) oraz Ryciny (15) zawierające obok wykresów, zdjęcia i schematy. Tak zorganizowany rozdział ułatwia usystematyzowanie oraz zrozumienie otrzymanych wyników.

Na potrzeby realizacji celów badawczych Doktorant zmodernizował układ pomiarowy (interferometr laserowy). Wykonał interferometryczną analizę uwalniania bakteriofagów z hydrożelu agarozowego. Oceniał degradację i hamowanie dojrzałego biofilmu przez bakteriofagi. Wykonał analizę właściwości dyfuzyjnych i przeciwbakteryjnych dendrymerów oraz wybranych tiocukrów. Rozdział 5. Wyniki zawiera również analizę interferometryczną hydrożelu. Wyniki zostały przedstawione jako średnie z odchyleniem standardowym (SD) uzyskane z trzech niezależnych doświadczeń. Różnice uznano za istotne statystycznie dla poziomu $p < 0,05$. Choć niektóre dane wydają się być istotne statystycznie na wyższym poziomie.

W rozdziale 6. Dyskusja Doktorant skomentował poszczególne obszary badań i uzyskane wyniki. Dyskusja została przeprowadzona w oparciu o dane już opublikowane. Taka forma świadczy o wszechstronnej znajomości tematu oraz dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta.

Na zakończenie, w rozdziale 8. Piśmiennictwo, Doktorant konsekwentnie stosuje określone formatowanie co ułatwia poruszanie się w liście cytowanych prac. Część cytowani jest nie pełna, np. nie zawiera numeru doi. Dodatkowo pojawiają się ale rzadko błędy edycyjne np. jak w pozycji 16 na stronie 78. Zabrakło mi również spisu wszystkich prac opublikowanych z udziałem Doktoranta.

Rozprawa doktorska kończy się wnioskami, które korelują uzyskane wyniki z postawionym celem badawczym. Doktorant stwierdził, że zoptymalizowany interferometr laserowy pozwala na ilościową analizę degradacji biofilmu bakteryjnego przez bakteriofagi, dyfuzji kationowych dendrymerów karboksykrzemianowych, czy tiocukrów oraz analizę uwalniania fukanazolu i degradację przez lizozym polimeru typu hydroksyapatyt. Ponad to, wykazał, że:

- bakteriofagi LUZ19, KTN4 oraz KT28 hamują tworzenie i degradują dojrzały biofilmu *P. aeruginosa* PAO1,
- karboksykrzemianowe kationowe dendrymery modyfikowane PEG800 dyfundują przez biofilm bakterii w przeciwieństwie do formy zawierającej grupę amonową,
- wybrane tiocukry mają właściwości przeciwbakteryjne, co jest związane z ich właściwościami transportowymi przez biofilm bakterii,
- lizozym degradowuje polimer typu hydroksyapatyt.

Pod kątem merytorycznym, przedstawiona rozprawa doktorska zasługuje na wysoką ocenę, jednak chciałbym zwrócić uwagę na pewne ogólne zastrzeżenia czy nie zaspokojoną ciekawość:

- rozdział 3. Materiały zawiera opis modeli bakteriofagów, jednak brakuje tutaj opisu podstawowych właściwości np. czy są organizmami modelowymi, w jaki sposób są indukowane czy utrzymywane w warunkach doświadczalnych? Dodatkowo, nasuwa się pytanie o dobór modeli badawczych. Jakie były kryteria doboru układów biologicznych wykorzystanych w przeprowadzonych badaniach.
- Tabela 2 ze strony 39 zawiera numerację. Z jakiego powodu autor nie zachował ciągłej numeracji?
- W rozdziale Metody zabrakło mi opisu kuwet układu dyfuzyjnego, np. z czego były wykonane, jaki miały kształt?
- W rozdziale 5. Wyniki (Rycina 24) - nie jest jasne w jakich jednostkach przedstawiono dane dotyczące osi pionowej. Podobnie jest w Rycinie 25 i 28, 32.
- W tym samym rozdziale, Rycina 26 przedstawia zdjęcia mikroskopowe z opisem uzyskanego sygnału czerwonego i zielonego. Jednak nie został opisany sygnał żółty, który jak się domyślam jest wynikiem nałożenia sygnału czerwonego i zielonego. Czego jest wynikiem taka obserwacja? Dodatkowo nie została zamieszczona skala uzyskanych obrazów. Wydaje się, że określenie powiększenia nie do końca odzwierciedla skali fotografowanych obiektów. Ostatni komentarz dotyczy również Ryciny 29, 31 i 33.
- W kilku miejscach, pojawiły się błędy edytorskie takie jak brak kropek, przecinków czy literówki.



Wymienione powyżej uwagi nie wpływają na wysoką ocenę wartości merytorycznej rozprawy. Pragnę podkreślić, że Pan mgr Jarosław Rachuna znakomicie wywiązał się z postawionych zadań z wykorzystaniem szerokiego spektrum technik i metod biofizycznych, biochemicznych czy biologii molekularnej. Wydaje się, że praca wypełnia lukę badawczą a podjęta tematyka jest aktualna i ma potencjał publikacyjny czy aplikacyjny.

Stwierdzam z całą przekonaniem, że rozprawa doktorska Pana mgr Jarosława Rachuny pt. „Optymalizacja systemu interferometrycznego do badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych bakteriofagów i wybranych związków chemicznych” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Zatem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Jarosława Rachuny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK KATEDRY


Dr hab. Piotr Bednarczyk, prof. SGGW

Dr hab. Piotr Bednarczyk, prof. SGGW