



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE  
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

---

Wrocław, dnia 21.12.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr inż. Michała Wójcickiego**

**pt. „Wykorzystanie potencjału bakteriofagów w biokontroli wybranych bakterii z rzędu  
*Enterobacterales* występujących w łańcuchu żywnościowym”**

wykonanej w

Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Waclawa Dąbrowskiego-  
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

pod opieką

Promotora: dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB

dr hab. inż. Barbary Sokołowskiej, prof. IBPRS-PIB



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Przedstawiona do recenzji dysertacja mgr inż. Michała Jakuba Wójcickiego zatytułowana „Wykorzystanie potencjału bakteriofagów w biokontroli wybranych bakterii z rzędu *Enterobacterales* występujących w łańcuchu żywnościowym” ma postać cyklu pięciu publikacji powiązanych tematycznie. Jest on zgodny z wymaganiami art. 187 ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 ze zm.), przygotowany w trybie eksternistycznym, o którym mowa w art. 197 pkt 2 Ustawy. Prace zawarte w ocenianym cyklu zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR w latach 2021-2023. Cztery z publikacji to prace oryginalne opublikowane w: *Int. J. Mol. Sci.* (IF 6,208 i 140 pkt MEiN), *Viruses* (IF 4,7, 100 pkt MEiN), *Pathogens* (IF 3,7, 100 pkt MEiN) oraz w *Int. J. Mol. Sci.* (IF: 5,6, 140 Pkt MEiN) oraz jedna praca przeglądowa opublikowana w *Pathogens* (IF: 4,531, 100 pkt MEiN). Sumaryczna wartość ich IF wynosi 24,739 oraz sumaryczna wartość Punktacji Ministerialnej (pkt MEiN) wynosi 580.

We wszystkich publikacjach składających się na cykl, będący podstawą rozprawy, Doktorant jest pierwszym Autorem. Warta podkreślenia jest również pozycja mgr inż. Michała Wójcickiego jako autora korespondencyjnego w trzech publikacjach składających się na rozprawę doktorską, co wskazuje na znaczący i wiodący udział Doktoranta zarówno w projektowaniu i wykonaniu badań jak i przygotowywaniu manuskryptów wskazanych publikacji. Jednocześnie skład autorski tych publikacji wskazuje na duże wsparcie i współdziałanie zespołu badawczego w realizacji badań, których wyniki zawarte są w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Dysertacja liczy łącznie z piśmiennictwem 381 stron i posiada tradycyjny układ dla tego typu rozpraw doktorskich: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, wstęp, wykaz zastosowanych skrótów, wykaz publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, przegląd piśmiennictwa, cele, hipotezy badawcze cel i zakres pracy, materiały i metody, omówienie wyników przedstawionych do ocen, stwierdzenia i wnioski, spis literatury oraz aneks w skład którego wchodzi publikacje stanowiące rozprawę doktorską oraz oświadczenia dot. wkładu współautorów w publikacje wchodzące w skład cyklu, wykaz pozostałych osiągnięć naukowych Doktoranta oraz zgoda na udostępnienie pracy w bibliotece. Podsumowując, układ recenzowanej dysertacji jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań. Do dokumentacji rozprawy dołączone są oświadczenia współautorów opublikowanych prac oraz Doktoranta, w których szczegółowo opisano wkład w prace będące przedmiotem w/w rozprawy, które jednocześnie jednoznacznie wskazują na znaczący wkład Kandydata w opracowanie koncepcji przeprowadzonych badań, wykonywanie części badawczej, opracowanie i interpretację wyników oraz przygotowanie publikacji naukowych składających się na cykl publikacji powiązanych tematycznie i będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Rozprawa spełnia kryteria formalne (art.187) Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2020 poz. 85 z późn. zm.).

Doktorant przejrzyście i rzeczowo precyzuje w Autoreferacie cel pracy, jako ocenę możliwości wykorzystania bakteriofagów litycznych w biokontroli żywności minimalnie





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

przetworzonej pochodzenia roślinnego. Ponadto formułuje cele szczegółowe, które systematyzują i porządkują schemat badawczy Doktoranta i stanowią je:

1. Genetyczna identyfikacja i klasyfikacja wybranych szczepów bakterii z rzędu *Enterobacterales* wyizolowanych z łańcucha żywnościowego.
2. Określenie profili oporności na wybrane antybiotyki oraz mechanizmów antybiotykooporności pałeczek z rzędu *Enterobacterales*.
3. Określenie aktywności wyizolowanych bakteriofagów oraz zakresu bakteryjnych gospodarzy.
4. Analiza morfologiczna i charakterystyka genomyczną wytypowanych bakteriofagów.
5. Ocena skuteczności koktajlu bakteriofagowego w poprawie jakości mikrobiologicznej wybranych minimalnie przetworzonych matryc żywnościowych.

Założenia i metody pracy, dobór technik badawczych i analiza uzyskanych wyników nie budzą zastrzeżeń. Doktorant wykazał się znajomością zaawansowanych technik mikrobiologicznych, mikroskopii elektronowej oraz biologii molekularnej. Warsztat technik jest wyważony, zapewnia uzyskanie jednoznacznych wyników przy przyjętych metodach walidacji i weryfikacji. Świadczy o dużej wiedzy Doktoranta oraz odpowiedzialności naukowej. Dane doświadczalne są starannie udokumentowane i opisane. Piśmiennictwo wskazane w Autoreferacie obejmuje 214 pozycji bezpośrednio związanych z tematyką pracy – jest właściwie dobrane i odpowiednio cytowane.

Doktorat w temacie swojej pracy podjął niezwykle ważny problem zarówno z punktu widzenia gospodarczego jak i epidemiologicznego - poszukiwanie metody zapewniającej bezpieczeństwo biologiczne żywności świeżej czy nisko przetworzonej pochodzenia roślinnego. Ze względu na prawdopodobieństwo skażenia mikrobiologicznego świeżej jak i minimalnie przetworzonej żywności pochodzenia roślinnego, poszukiwane są innowacyjne metody jej ochrony zapewniające jednocześnie zachowanie wysokiej jakości produktów, wydłużenie przydatności do spożycia. Wśród bakterii obecnych w produktach żywnościowych (zarówno saprofitycznych, jak i patogennych) obserwuje się szczepy odporne na antybiotyki. Oporność bakterii na antybiotyki jest obecnie poważnym problemem globalnym. Na skutek nieracjonalnego stosowania antybiotyków zarówno w medycynie, czy rolnictwie, bakterie nabywają na nie oporność, zjawisko to lawinowo wzrasta, a jego ograniczenie stanowi wyzwanie zarówno dla współczesnej medycyny jak i przemysłu spożywczego. Jedną z alternatyw dla antybiotyków mogą stanowić bakteriofagi będące wirusami bakteryjnymi charakteryzującymi się swoistością działania, które z jednej strony mogą przyczynić się do ograniczenia rozprzestrzeniania wśród bakterii oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, ale także mogą stanowić naturalne „narzędzie” do zwalczania patogennych bakterii zawartych w produktach spożywczych. Oprócz ograniczeń legislacyjnych z perspektywą wprowadzenia preparatów fagowych do powszechnego obrotu, wiąże się nie tylko kwestia ich skuteczności i





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

bezpieczeństwa, ale przede wszystkim zdolność fagów zawartych w preparacie do zachowania aktywności litycznej zarówno podczas jego przechowywania, jak i po ich zastosowaniu.

Podjęcie przez Doktoranta aktualnego tematu wpisującego się w trend badań prowadzonych nie tylko w Polsce ale i na świecie będącego przedmiotem niniejszej dysertacji zaowocowało oryginalnymi i ciekawymi wynikami naukowymi istotnie wzbogacającymi wiedzę naukową w dyscyplinie w technologia żywności i żywienia.

Mocną stroną badań przeprowadzonych w ramach prezentowanej rozprawy są dobrze zaplanowane badanie, wnikliwe zapoznanie się z dostępną wiedzą naukową w poruszanej tematyce oraz dbałość o precyzyjny warsztat naukowo-badawczy. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktoranta do tematyki pracy doktorskiej, przemyślanym i krytycznym planowaniu badania, skrupulatnej analizie dostępnych danych literaturowych. Autor potrafił w przystępnej, syntetycznej formie przedstawić całość zagadnienia, naświetlić cele i przebieg badań.

Doktorant w wyniku przeprowadzonych badań wyizolował ze ścieków komunalnych i scharakteryzował cztery nowe bakteriofagi lityczne swoiste wobec bakterii saprofitycznych stanowiących mikroflorę obecną w produktach żywnościowych pochodzenia roślinnego. Były to fagi swoiste wobec: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Citrobacter freundii*, *Serratia fonticola*. Określone zostały podstawowe parametry cyklu życiowego, współczynnik infekcji, zsekwencjonowano genomy nowoizolowanych fagów i na podstawie struktury genomu także rodzaj cyklu życiowego jak i przynależność taksonomiczną. Zbadano również stabilność fagów w różnych warunkach temperatury i pH. W Dysertacji Doktorant uzupełnił jeszcze dane dotyczące fagów o wyniki spektrum litycznego. We wnioskach z pracy autor wskazał, że badane bakteriofagi mogą stanowić obiecujący czynnik zarówno służący do biokontroli żywności co może mieć przełożenie praktyczne na wydłużenie trwałości produktów żywnościowych pochodzenia roślinnego.

W drugiej doświadczalnej publikacji naukowej Doktorant przeprowadził badanie efektywności koktajlu fagowego wobec saprofitycznych bakterii występujących w gotowych do spożycia produktach pochodzenia roślinnego. Do tej pracy mam pytanie: dlaczego Doktorant zdecydował się na umieszczenie w koktajlu aż 43 fagów? Czy zbadane zostało wcześniej spektrum lityczne fagów uwzględnionych w preparacie? Być może zakresy gospodarzy badanych fagów mogły się pokrywać i nie było potrzeby umieszczania aż tak dużej liczby fagów w preparacie do zastosowania. Ponadto, czy zbadane zostały możliwe interakcje między fagami (możliwe zjawisko synergizmu lub antagonizmu) przy opracowywaniu składu finalnego preparatu?

W przedstawionej do oceny w ramach cyklu pracy przeglądowej Doktorant opisał kompleksowo regulację transkrypcyjną mechanizmów oporności występujących u *Salmonella*.

W czwartej pracy przebadanych zostało 43 szczepy *Salmonella enterica* pod kątem obecności genów kodujących czynniki wirulencji występujące wśród tych szczepów jak i ich





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

fenotypowy profil wrażliwości na antybiotyki. Zaobserwowano, że połowa badanych szczepów charakteryzowała się wielolekoopornością.

W ostatniej ocenianej publikacji Doktorant scharakteryzował dwa nowe lityczne fagi *Salmonella* phage vB\_Sen-IAFB3829 (KKP 3829) oraz *Salmonella* phage vB\_Sen-IAFB3830 (KKP 3830) wyizolowane ze ścieków komunalnych odpowiednio na szczepach gospodarzy *S.* I (6,8:l,-:1,7) KKP 1762 oraz *S. Typhimurium* KKP 3080 oraz przedstawił wyniki skuteczności ich zastosowania w ograniczeniu rozwoju bakterii w świeżym soku marchewkowo-jabłkowym. Badane fagi zostały zaklasyfikowane do klasy *Caudoviricetes*. Do tej pracy mam uwagę: ze względu na fakt, że Doktorant oceniał skuteczność zarówno pojedynczych (opisanych w pracy kompleksowo fagów KKP 3829 i KKP 3830), jak i koktajlu składającego się z czterech fagów (oprócz wspomnianych wcześniej także fagów KKP 3822 oraz 3831) brakuje w rozprawie informacji odnośnie spektrum litycznego pozostałych dwóch fagów uwzględnionych w składzie koktajlu. Jak Doktorant wytłumaczy uwzględnienie w koktajlu zarówno faga KKP 3829 jak i KKP 3830? W sytuacji gdy badania spektrum litycznego tych dwóch fagów wykazały, że KKP 3830 nie był aktywny wobec badanych szczepów bakteryjnych, które nie są wrażliwe także na faga KKP 3829 (Tabela 3)?

W wyniku przeprowadzonych badań z wykorzystaniem świeżych soków Doktorant zaobserwował, że zastosowany koktajl fagowy skutecznie ograniczał wzrost patogennych bakterii, co może wskazywać na znaczący potencjał zastosowania fagów w ochronie nisko przetworzonej żywności pochodzenia roślinnego przed skażeniem mikrobiologicznym, zapewniając jednocześnie dłuższą jakość produktów świeżych. Jednak, jak słusznie zauważył Doktorant przy kolejnych badaniach bądź w aspekcie praktycznego wykorzystania badanych fagów/ koktajlu sugerowałabym zastosowanie wyższego miana fagów w preparacie. Zgodnie z informacją zawartą w rozprawie Doktorant nie przeprowadził badań stabilności długoterminowej zarówno pojedynczych fagów, jak i koktajlu, co jak zostało wspomniane mogło w znaczący sposób wpłynąć na aktywność fagów w badanym soku o niskim pH.

Na podstawie przeprowadzonych i omówionych badań zawartych w cyklu pięciu artykułów naukowych sformułowano następujące stwierdzenia i wnioski:

1. Wśród wyizolowanych i testowanych bakterii saprofitycznych, prawie 20% stanowiły szczepy wielolekooporne, co wskazuje na konieczność monitorowania przenoszenia antybiotykooporności w łańcuchu żywnościowym.
2. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* wykazują fenotypową oporność na wiele antybiotyków (50,9% szczepów MDR) i kodują liczne geny związane z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe.
3. Duża liczba opornych szczepów *Salmonella* w połączeniu z wieloma ARGs potwierdza wieloletnie nieracjonalne stosowanie antybiotyków.
4. Ścieki komunalne są bogatym źródłem bakteriofagów litycznych specyficznych zarówno wobec bakterii saprofitycznych, jak również patogennych występujących w minimalnie przetworzonej żywności pochodzenia roślinnego.





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

5. Bakteriofagi zachowały swoją aktywność w szerokim zakresie temperatur i kwasowości czynnej, co może umożliwić w przyszłości ich wykorzystanie w połączeniu z konwencjonalnymi metodami utrwalania żywności (np. w technologii płatków). Ekspozycja fagów na promieniowanie UV zmniejszała ich aktywność proporcjonalnie do czasu tej ekspozycji.
6. Analiza genomów wszystkich nowo wyizolowanych bakteriofagów wykazała, że nie kodują one genów wirulencji ani toksyn i można je sklasyfikować jako bakteriofagi obligatoryjnie lityczne (wirulentne). Charakterystyka zjadliwości i brak możliwych czynników wirulencji sprawiają, że fagi te mogą w przyszłości być potencjalnymi kandydatami do biokontroli żywności.
7. Zastosowanie koktajlu fagowego skutecznie ograniczyło rozwój bakterii saprofitycznych w trzech testowanych produktach podczas przechowywania (tj. rukola, mieszanka sałat z marchewką oraz mieszanka sałat z burakiem). Nie zaobserwowano pozytywnego wpływu zastosowanego koktajlu fagowego na redukcję liczby bakterii w szpinaku, co może świadczyć o niedostatecznej bioróżnorodności fagów w opracowanym biopreparacie w stosunku do mikrobioty bakteryjnej produktu.
8. Zastosowanie bakteriofagów do matryc żywnościowych istotnie obniżyło poziom zanieczyszczenia pałeczkami *Salmonella* w porównaniu z próbami kontrolnymi.
9. W przyszłości kluczowe będzie opracowanie szerokospektralnych koktajli fagowych opornych na czynniki środowiska produkcyjnego.
10. Pomimo braku dopuszczenia biopreparatów fagowych do komercyjnego stosowania w krajach członkowskich UE, stale wzrastająca wielolekooporność bakterii może doprowadzić w niedalekiej przyszłości do konieczności implementacji biokontroli fagowej do procesów produkcyjnych żywności.

Badania przeprowadzone przez mgr inż. Michała Wójcickiego mają zatem istotne implikacje poznawcze i praktyczne. Stanowią element nowości, oryginalne osiągnięcie Doktoranta. Podsumowując wyniki opisane w recenzowanej rozprawie doktorskiej stanowią znaczący wkład w dotychczasową wiedzę dotyczącą możliwości zastosowania fagów w ochronie żywności przed skażeniem bakteriami z rzędu *Enterobacteriales*, są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, gdyż otwierają perspektywy praktycznego zastosowania zarówno w ograniczeniu mikrobiologicznego skażenia żywności, a jednocześnie ograniczeniu rozprzestrzeniania zjawiska oporności bakterii na antybiotyki.

Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem z użyciem prawidłowej stylistyki i terminologii. Wartość merytoryczna publikacji idzie w parze z umiejętnością argumentacji i polemiki. Edycja pracy nie budzi zastrzeżeń.

Wszystkie wymienione wcześniej uwagi czy zastrzeżenia w żaden jednak sposób nie umniejszają wartości pracy. Po wnikliwej lekturze dysertacji zatytułowanej „Wykorzystanie potencjału bakteriofagów w biokontroli wybranych bakterii z rzędu *Enterobacteriales* występujących w łańcuchu żywnościowym” oceniam ją bardzo wysoko. Jest to obszerne i samodzielne opracowanie i rozwiązanie oryginalnego zagadnienia naukowego przy użyciu





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

nowoczesnych metod i jest dowodem umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

### PODSUMOWANIE

Oceniana dysertacja doktorska mgr inż. Michała Jakuba Wójcickiego pt. „Wykorzystanie potencjału bakteriofagów w biokontroli wybranych bakterii z rzędu *Enterobacterales* występujących w łańcuchu żywnościowym” wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Waława Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie pod opieką promotor: dr hab. Edyty Juszczuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB oraz dr hab. inż. Barbary Sokołowskiej prof. IBPRS-PIB spełnia kryteria stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora zdefiniowane w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2020 poz. 85 z późn. zm.). Recenzowana przez mnie rozprawa doktorska autorstwa Michała Jakuba Wójcickiego prezentuje adekwatną ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie w technologia żywności i żywienia oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej potwierdzonej publikacją wyników będących podstawą rozprawy doktorskiej w czasopiśmie naukowym o znaczącym współczynniku wpływu. Przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego o potencjale aplikacyjnym, a indywidualny wkład Kandydata w powstanie tej pracy jest dobrze udokumentowany. Chciałabym także zwrócić uwagę na dorobek naukowy Doktoranta, który jak na ten etap kariery jest bardzo dobry. Doktorant autorem 21 publikacji, 5 artykułów popularnonaukowych, aktywnie uczestniczył w konferencjach naukowych, był także kierownikiem projektów realizowanych w ramach działalności statutowej IBPRS-PIB oraz kierownikiem projektu w ramach Programu POIR. Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Waława Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Michała Jakuba Wójcickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową oraz potencjał aplikacyjny przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy Doktoranta wnioskuję do Wysokiej Rady Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Waława Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Jakuba Wójcickiego.

*E. Jończyk-Matysiak*

dr hab. Ewa Jończyk-Matysiak

LABORATORIUM BAKTERIOFAGOWE  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk  
Wrocław

